



Kandidaattitutkielma

Kystinen fibroosi ja CFTR

Veera Puukka

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	4
2	ABC-KULJETTAJAPROTEIINIT	5
2.1	ABC-KULJETTAJAPROTEIINIEN RAKENNE	6
3	CFTR	8
3.1	CFTR-PROTEIINI	9
3.1.1	CFTR-rakenne	9
4	CFTR-MUTAATIOIT	12
4.1	CFTR-MUTAATIOIDEN LUOKITTELU	13
4.1.1	Luokittelun ongelmat	17
5	SAIRAUDET JA OIREET	17
5.1	HENGITYSTIE- JA KEUHKOSAIRAUDET	18
5.2	HAIMAN OIREET JA SAIRAUDET	19
5.3	RUOANSULATUSKANAVAN OIREET	20
5.4	MAKSAN- JA SAPPIJÄRJESTELMÄN OIREET	20
5.5	MUUT OIREET	21
6	DIAGNOOSI	22
6.1	NBS	23
6.2	GENEETTINEN DIAGNOOSI	24
6.3	DIAGNOOSIN ONGELMAT	25
7	HOITO	26
7.1	GEENITERAPIA	27
7.2	IVACAFTOR/VX-770	28
7.3	MUUT MODULAATTORIT	29
8	JOHTOPÄÄTÖKSET	32
9	LÄHTEET	33

Käytetyt lyhenteet

KF	kystinen fibroosi
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ABC	ATP binding cassette
ATP	adenosiinitrifosfaatti
TMD	transmembrane domain
NBD	nucleotide-binding domain
TM	transmembrane
cAMP	syklinen adenosinimonofosfaatti (cyclic adenosine monophosphate)
CL	cytoplasmic loop
PKA	proteiinikinaasi A
PKC	proteiinikinaasi C
NK	nuclear factor
CFRD	cystic fibrosis related diabetes
IRT	immunoreaktiivinen trypsinogeeni
FEV1	uloshengityksen sekunttikapasiteetti
SeV	sendai virus

1 Johdanto

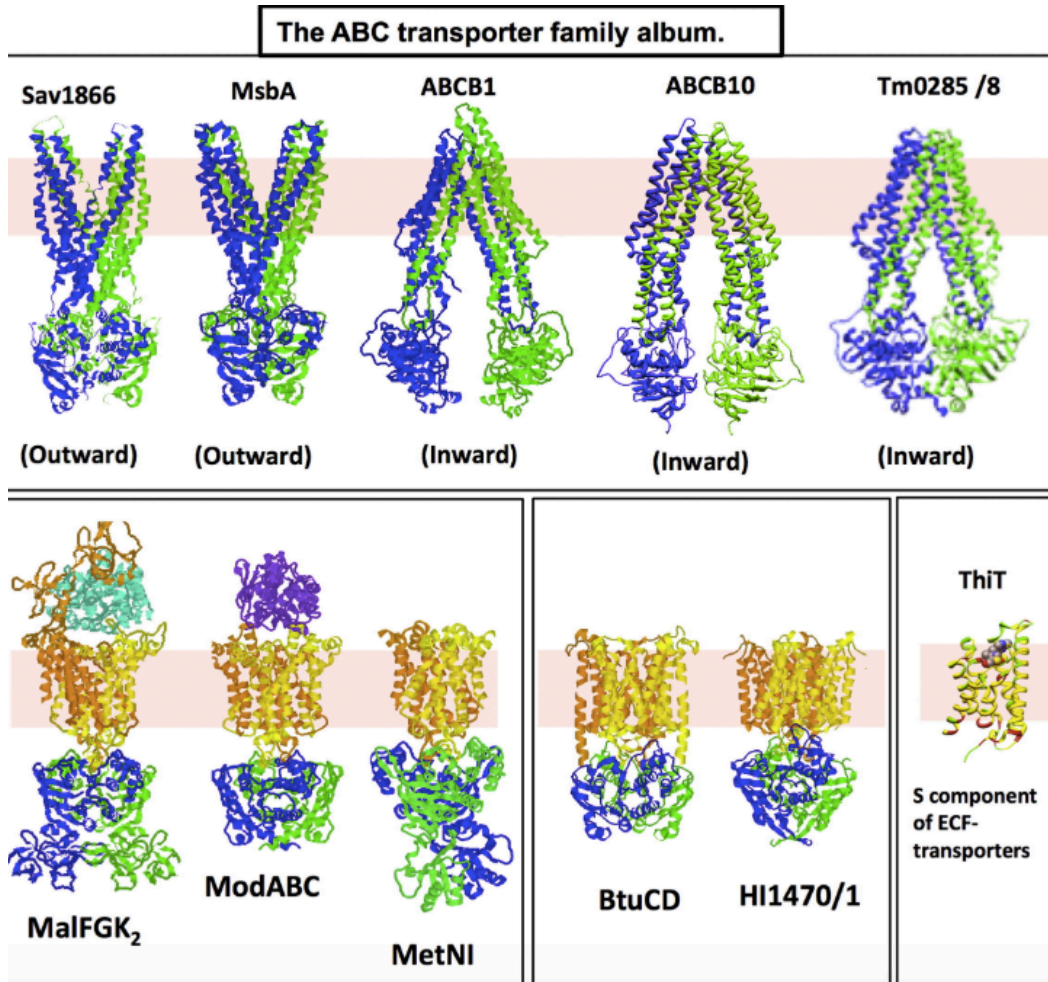
Kystinen fibroosi (KF) on terminaalinen aineenvaihduntasairaus, jota esiintyy ensisijaisesti eurooppalaista alkuperää olevilla henkilöillä. Maailmanlaajuisesti kystiseen fibroosiin sairastuneita on noin 70 000. Kystinen fibroosi on resessiivisesti periytyvä autosomaalinen sairaus, joka aiheuttaa lukuisia terveydellisiä ongelmia eripuolilla elimistöä (Cutting 2015). Kystinen fibroosi aiheutuu yhden geenin mutaatiosta. Kyseinen geeni on nimeltään Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-geeni. Se koodaa CFTR-proteiinia, jonka rakenne ja toiminta muuttuu mutaation seurauksena. CFTR-proteiini kuuluu ABC-kuljettajaproteiinien perheeseen (Liu *et al.* 2017). Kystistä fibroosia aiheuttavat mutaatiot sijaitsevat kaikkialla CFTR-geenissä ja ne periytyvät eteenpäin lähes aina (Patrick & Thomas 2012). CFTR-proteiinin toiminnan häiriöt aiheuttavat monenlaisia ongelmia eripuolilla elimistöä. Tärkein rooli sillä on hengitysteiden epiteelin pinnalla, jossa se toimii kloridi- ja vetykarbonaatti-ionien kuljettajaproteiinina. Lisäksi se säätelee muiden ionikanavien toimintaa ja on kontaktissa monien kalvoproteiinien kanssa ylläpitääkseen epiteelin liitoksia ja nestekerrosta. CFTR-proteiini säätelee neste-eritteiden happamuutta sekä neste- ja kloridi-ionien tasapainoa. Toimintojen heikentyminen tai estyminen johtaa kystisen fibroosin tyypillisimpiin oireisiin, kuten hengitysteiden ja haiman sairauksiin (Liou 2019). Sairaus vaikuttaa moniin eri elimiin, mutta keuhkojen- ja hengityselimistön heikentyminen sairauden edetessä ovat noin 90 %:ssa syynä potilaiden menehtymiseen (Burney & Davies 2012). Suurimpana ongelmana kystisessä fibroosissa on paksun ja elastisen liman kertyminen eri elinten epiteelikerroksen pinnalle. Vaikutus kohdistuu ensisijaisesti keuhkoihin ja haimaan, mutta vaikuttaa myös vatsalaukun ja kivesten toimintaan. Liman kertyminen johtaa tukkeumiin, tulehduksiin ja mahdollisesti myöhemmin myös näiden elinten vajaatoimintaan tai niiden pettämiseen lopullisesti (Cant *et al.* 2014).

CFTR-geeniin kohdistuvia kystistä fibroosia aiheuttavia mutaatioita on tunnistettu noin 2000. Ne voidaan luokitella kuuteen eri luokkaan sen mukaan, miten mutaatio vaikuttaa CFTR-proteiinin toimintaan. Ensimmäisten kolmen luokan mutaatiot aiheuttavat vakavamman muodon kystisestä fibroosista, joka yleensä diagnosoidaan jo lapsuudessa. Aikuisuudessa diagnosoitu kystinen fibroosi viittaa yleensä KF:n lievempään muotoon, eli mutaatioihin, jotka kuuluvat luokkaan IV, V tai VI (Bowen & Hull 2015). Lääkehoitojen kehittyminen on johtanut siihen, että tällä hetkellä kaksi keskeisintä potilasryhmää ovat: aikuiset, joiden diagnoosi on tehty lapsuudessa ja sairastavat vakavampaa taudin muotoa; aikuiset, joiden oireet ovat alkaneet vasta aikuisuudessa. Nykyään keskeisiin hoitokeinoihin antibioottien lisäksi kuuluu modulaattoreita, joiden tarkoitus on kohdistua suoraan taudin aiheuttajaan (Bonadia *et al.* 2014).

2 ABC-kuljettajaproteiinit

CFTR-proteiini kuuluu isompaan ABC-kuljettaja (ATP binding cassette) proteiinien joukkoon, mutta toimii soluissa ionikanavana siirtäen kloridi ioneja (Patrick & Thomas 2012). ABC-kuljettajia löytyy kaikista eliökunnista, ja ne siirtävät substraatteja solukalvojen läpi ATP hydrolyysin avulla. ABC-kuljettajia ovat eksporttereita ja importtereita, joita on pääasiassa vain prokaryooteilla. Kuljetus tapahtuu ATP:n avulla konsentraatio gradienttia vastaan. ABC-kuljettajat siirtävät muun muassa pieniä ioneja, aminohappoja, proteiineja ja joitain lääkkeitä, jotka ovat tärkeitä solujen signaloinnin, proteiinin tuotannon ja antigeenien muodostumisen kannalta. Tästä syystä monet ABC-kuljettajiin kohdistuvat mutaatiot johtavat moniin tunnettuihin sairauksiin. Kystisen fibroosin lisäksi ABC-kuljettajiin kohdistuvia sairauksia ovat esimerkiksi Stargardtin tauti ja Tangier tauti (Cant *et al.* 2014).

Kaikilla ABC-kuljettajilla on samankaltainen rakenne, johon kuuluu kaksi solukalvon läpäisevää domeenia TMD1 ja TMD2 (Transmembrane domain) ja kaksi nukleotideja sitovaa domeenia NBD1 ja NBD2 (Nucleotide-binding domain). Nämä yksiköt keskenään muodostavat perusyksikön, jonka avulla kuljetus solukalvon läpi tapahtuu. Arkeissa ja bakteereissa nämä neljä domeenia oligomerisoituvat muodostaen toimivan rakenteellisen yksikön. Eukaryooteilla domeenit puolestaan muodostavat yhden polypeptidiketjun. Kuvassa 1 on röntgenkristallografialla saadut rakennekuvat kymmenestä erilaisesta ABC-kuljettajasta. Tällä hetkellä yhdestäkään ABC-kuljettaja proteiinista ei ole saatu kristallograafista rakennekuvaa niiden jokaisessa mahdollisessa konformaatioissa. Bakteerien maltoosin kuljettaja proteiinista on saatu eniten sen kuljetus prosessia kuvaavia konformaatio kuvia kristallografisen menetelmän avulla (Cant *et al.* 2014).



Kuva 1 ABC-kuljettajaproteiinien rakenteita, joiden TMD-kierteet on tunnistettu. Ylemmässä osassa kuvaa on eksporttereita, johon myös CFTR-proteiini kuuluu. Näissä rakenteissa näkyy TMD:n ja NBD:n liittymisen yhtenäiseksi rakenteeksi. Alempana kuvassa on importtereita, joiden TMD-kierteet ovat huomattavasti lyhyempiä kuin eksporttereiden rakenteissa. Näissä rakenteissa solukalvon läpäisevien domeenien kierteitä on useampia ja ne poikkeavat eksporttereiden kierteisistä rakenteista (Cant et al. 2014).

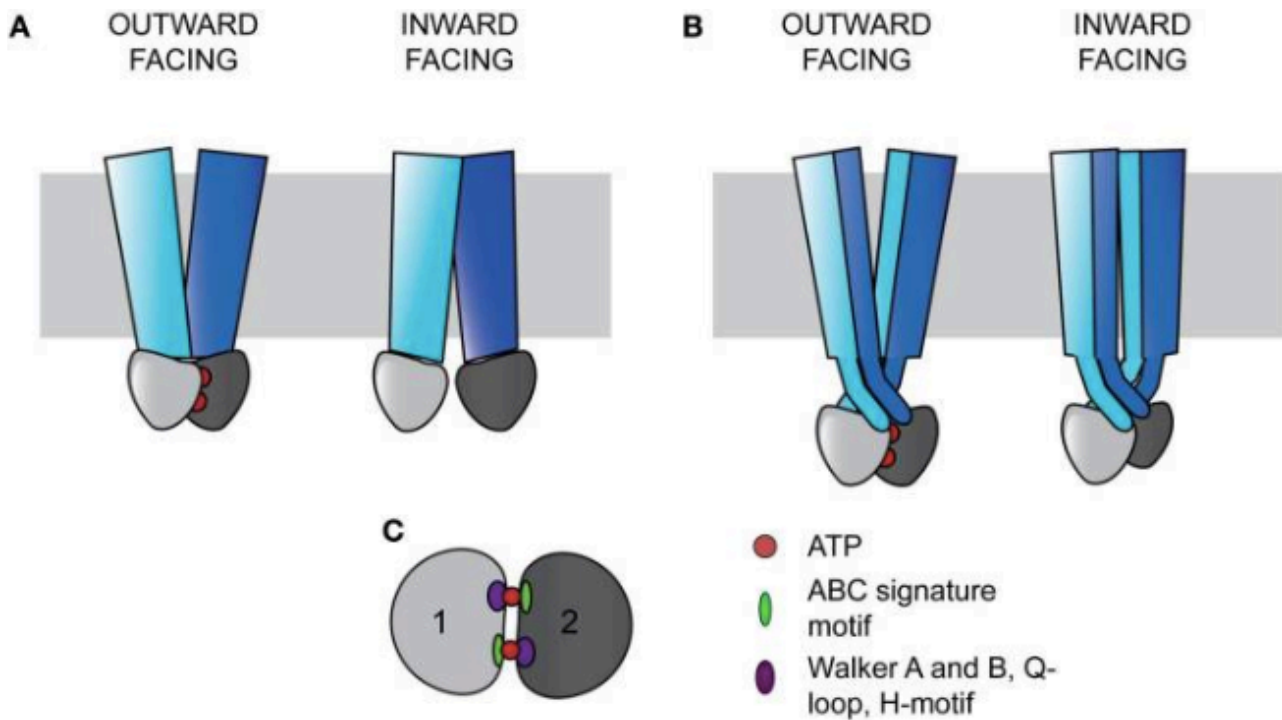
ABC-kuljettajien TMD-rakenteiden tutkimus on hankalaa, koska niiden substraattien kirjo on erittäin laaja. NBD1:n ja NBD2:n rakenteet ovat puolestaan yksinkertaisempia. Tutkimusten perusteella onkin ehdotettu universaalia ABC-kuljettajien ATP-hydrolyysin mekanismia, jossa keskeisessä osassa ovat NBD1:n ja NBD2:n Walker A- ja Walker B-motiivit (Cant et al. 2014).

2.1 ABC-kuljettajaproteiinien rakenne

Substraattien kuljetus signaali kulkeutuu NBD-rakenteista TMD-rakenteen kierteisiin osiin. NBD1 ja NBD2 muodostavat rakenteen, jossa kaksi ATP molekyyliä on niiden välissä. Molemmilla sivuilla on ATP:lle liittymiskohta ja kaksi subdomeenia. Katalyyttisessä subdomeenissa on Walker A-motiivi, Walker B-motiivi, Q-kierre ja H-motiivi. Alfaheeliksisessä subdomeenissa on ABC-kuljettajille tyypillinen LSGGQ-motiivi. Molemmat aktiiviset kohdat koostuvat NBD:n katalyyttisestä

alayksiköstä ja toisen NBD:n alfaheeliksisistä osista. Kokonaisuus muodostaa niin sanotun ”head-to-tail”-rakenteen. ABC-kuljettajat voidaan jakaa kolmeen luokkaan sen mukaan, miten niiden TMD:t ovat laskostuneet. Luokassa I ja II ABC-importtereilla on poikkeava solukalvon läpäisevä (TM) osa, joka on toisessa 10 heeliksiä ja toisessa 20 heeliksiä. 20 heeliksiä sisältävät ABC-kuljettajat siirtävät yleensä suuremman kokoisia substraatteja verrattuna 10 heeliksiä sisältäviin ABC-kuljettajiin. Kummassakin luokassa TMD:t vaikuttavat NBD1:een ja NBD2:een, jolloin muodostuu kaksi TMD-NBD-yksikköä. Yhdessä nämä kaksi yksikköä muodostavat toimivan kuljettajaproteiinin. Kolmanteen luokkaan kuuluvat ABC-eksportterit. ABC-eksporttereilla on 12 solukalvon läpäisevää alfaheeliksi-keskusosaa. Eksportterin jokainen sivu koostuu molemmista TMD:stä niin, että kumpikin TMD on yhteydessä molempiin NBD-rakenteisiin. Muodostuneessa rakenteessa kierteiset osat ulottuvat sytoplasmaan. Tällöin rakenteen NBD:t asettuvat noin 25 Å:n etäisyydelle solukalvosta. Kolmannen luokan eksporttereiden TMD:t ja NBD:t ovat ekspressoituna yhteisenä yksikkönä. Eukaryoteissa ABC-eksportterit usein esiintyvät kokopitkinä kuljettajaproteiineina (Patrick & Thomas 2012).

ATP:n liittymisen ja hydrolyysin seurauksena signaalit NBD-rakenteista aiheuttavat TMD-rakenteiden liikkumisen siten, että substraattien liikkuminen kalvon läpi on mahdollista. Ulospäin kääntyneessä rakenteessa NBD1 ja NBD2 sitoutuvat ATP:hen, jolloin TMD-rakenteet ovat aukinaisessa asennossa. Sisäänpäin kääntyneessä rakenteessa NBD1 ja NBD2 ovat kauempana toisistaan, kun ATP ei ole sitoutunut rakenteeseen. Tällöin puolestaan TMD1 ja TMD2 ovat aukinaisessa asennossa sytosolin puolelle (Kuva 2) (Patrick & Thomas 2012).



Kuva 2 ABC-kuljettajaproteiinin rakenne, jossa havainnollistetaan TMD-rakenteiden ja NBD-rakenteiden orientaatio toisiinsa nähden. ABC-kuljettajissa on kaksi TMD:tä (turkoosi ja sininen) ja kaksi NBD:tä (harmaa ja vaaleanharmaa). A: ABC-importtereissa TMD-rakenteet ovat yhteydessä NBD-rakenteiden kanssa. B: ABC-eksporttereissa TMD-rakenteet ja NBD-rakenteet ovat kietoutuneet toisiinsa. C: NBD-rakenteet muodostavat niin sanotun "head-to-tail"-rakenteen ATP:n kanssa (Patrick & Thomas 2012).

3 CFTR

CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) on geeni, joka koodaa CFTR-proteiinia. CFTR-geeni koostuu 27 eksonista ja sijaitsee seitsemännessä kromosomissa (geeni sijaitsee kromosomin pidemmässä haarassa q31.2 asemassa). CFTR-geeni transkriptoidaan 6,13kb:n mRNA:ksi, joka koodaa 1480 aminohappoa pitkää CFTR-proteiinia. CFTR-proteiini toimii kloorikanavana epiteelisolun solukalvossa, ja sen toimintaa säädellään cAMP:n avulla (Bowen & Hull 2015). Kystinen fibroosi aiheutuu CFTR-geenin mutaatiosta, joka aiheuttaa poikkeavuuksia siitä koodatussa proteiinissa. Tunnettuja kystistä fibroosia aiheuttavia geeni mutaatioita tunnetaan tällä hetkellä noin 2000. Sairauden vaikeusaste vaihtelee näiden mutaatioiden mukaan. Lisäksi sairauden vakavuuteen vaikuttavat myös tietyt modifioivat geenit ja potilaiden elinympäristö sekä heidän sosioekonominen asemansa. Toimivan CFTR-proteiinin puutuessa kloridin ja vetykarbonaatin erityksessä kehossa estyy aiheuttaen natriumin absorboitumisen elimistöön. Natriumin absorptio aiheuttaa eritetyn liman paksuuntumisen, hengitysteiden epiteelien kuivumista (Veit *et al.* 2016).

3.1 CFTR-proteiini

CFTR-proteiini on luokiteltu ABC-kuljettajaproteiineihin, johon kuuluu ATP-hydrolyysin avulla substraatteja kuljettavia kalvokuljettajia (Pranke & Sermet-Gaudelus 2014). Spesifisesti CFTR kuuluu ABC-kuljettajien alaluokkaan C, jotka ovat kolmannen luokan eksporttereita. Tähän luokkaan kuuluu muun muassa bakteerien Sav1866, MsbA, TM287/288 ja nisäkkäiden P-glykoproteiini. Näiden eksporttereiden rakenne on saatu selville (Patrick & Thomas 2012). CFTR on yksi tutkituimmista ABC-kuljettajista, koska se on kystisen fibroosin hoitomenetelmien kehittämisen edellytys. CFTR-proteiini sijaitsee pääosin epiteelisolujen ulkokalvolla. Se toimii muun muassa hengitysteiden, ruuansulatuskanavan, haiman, kivesten ja erityis rauhasen nesteiden ja elektrolyyttien kuljettajaproteiiniina. CFTR-kuljettaa kloridi-ioneja kalvon läpi muodostaen huokosen. Muodostunut huokonen on anioniselektiivinen, kuljettaen kalvon läpi vain negatiivisesti varautuneita anioneja, kuten Cl^- , I^- ja F^- . Lisäksi CFTR-proteiini on läpäisevä myös joillekin substraateille kuten ATP:lle ja glutationille, sekä toimii säätelijänä muille kalvokuljettajille (Pranke & Sermet-Gaudelus 2014). CFTR-kanavan aukeamiseen tarvitaan ATP:tä, mutta varsinainen ionien kuljetus tapahtuu passiivisesti elektrokemiallisen gradientin suuntaisesti (Bowen & Hull 2015). CFTR-proteiinin tuotanto ja ekspressio soluissa on tarkasti säädeltyä ja sisältää monia eri solujen välisiä signalointi vaiheita. CFTR puolestaan itse säätelee monia signalointi kaskadeja, jotka niin ikään vaikuttavat yhdessä soluihin tai jopa koko elimen. Tästä syystä CFTR-proteiinin translaation jälkeinen muokkaus on monivaiheinen tapahtuma (Pranke & Sermet-Gaudelus 2014). CFTR:n normaali toiminta ja stabiili rakenne vaatii sen, että proteiini laskostuu oikein. Vain noin 30 % kehittyneestä proteiinista pääsee solukalvolle asti (Bowen & Hull 2015).

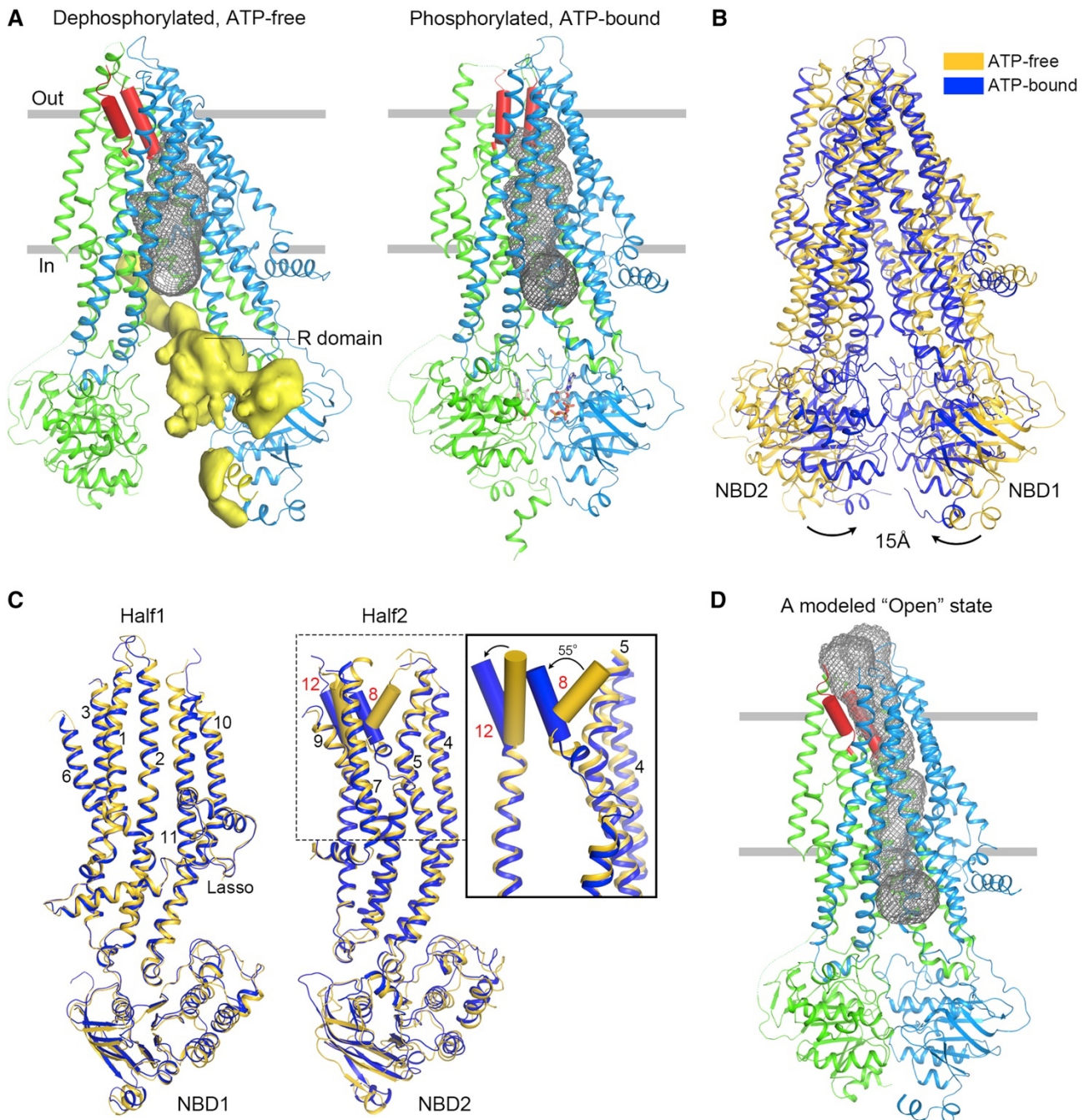
3.1.1 CFTR-rakenne

CFTR-proteiini koostuu 1480 aminohaposta, ja on rakenteeltaan tyypillinen ABC-kuljettaja. CFTR-proteiinin molekyylipaino on noin 170 kDa. Siinä on neljä domeenia, joista kaksi TMD:tä (TMD1 ja TMD2) läpäisevät solukalvon. Toiset kaksi NBD:tä (NBD1 ja NBD2) ovat nuklotideja sitovia osia. Näiden yhteen liittyneiden osien lisäksi sen rakenteeseen kuuluu säätelijädomeeni eli R-alue, joka sijaitsee TMD1:n ja NBD2:n välissä. R-alue on harvinainen rakenne ABC-kuljettajien joukossa (Pranke & Sermet-Gaudelus 2014). CFTR-proteiinin rakenne karboksyyli-päästä (C-terminaali) aminopäähän (N-terminaali) rakentuu siten, että TMD1 ja NBD1 ovat liittyneet toisiinsa sekä TMD2 ja NBD2 ovat liittyneet toisiinsa. Näiden neljän domeenin välissä sijaitsee R-alue (Cant *et al.* 2014). TMD1- ja TMD2-domeenit sisältävät molemmat kuusi solukalvon läpäisevää elementtiä. Nämä elementit ovat liittyneet toisiinsa solunulkosilla ja solun sisällä olevilla silmukoilla (CL1-4). Ne

muodostavat yhdessä solukalvon läpäisevän kanavan. NBD1:n ja NBD2:n rooli on sitoa ja hydrolysoida ATP:tä. cAMP:sta riippuvainen proteiinikinaasi A (PKA) tai proteiinikinaasi C (PKC) fosforyloi seriini-aminohappotähteitä, jotka sijaitsevat säätelijäalueella. R-alue säätelee myös kanava-porttia yhdessä NBD1:n ja NBD2:n kanssa. TMD:n silmukat (CL) ja NBD-rakenteiden toiminta ja vuorovaikutus yhdessä auttavat muodostamaan toimivan kloridi-ioni-kanavan. TMD1 ja TMD2 ovat yhteydessä NBD1:n kanssa sytoplasman silmukoiden 4 ja 1 (CL4 ja CL1) avulla. TMD1 ja TMD2 ovat yhteydessä myös NBD2:n sytoplasman silmukoiden 2 ja 3 (CL2 ja CL3) avulla (Pranke & Sermet-Gaudelus 2014).

CFTR-proteiinin NBD1 ja NBD2 muodostavat niin sanotun ”head-to-tail”- dimeerin, jossa ATP:n liittymiskohdat sijaitsevat näiden kahden yksikön (NBD1 ja NBD2) välissä. ATP:n liittymiskohta muodostuu NBD1:n Walker A- ja Walker B-motiivista sekä NBD2:n LSGGQ-motiivista. Toinen liittymiskohta muodostuu NBD2:n Walker A- ja B-motiivista sekä NBD1:n LSGGQ-motiivista. ATP:n ensimmäisellä liittymiskohdalla ei ole hydrolyyttistä aktiivisuutta, vaan sen tehtävänä on sitoa ATP:tä. Toinen ATP:tä sitova kohta puolestaan hydrolysoi ATP:n. Erilaisten tutkimusmenetelmien avulla on todettu, että CFTR-proteiinin huokosen aukeamista kontrolloi ATP:n sitoutuminen rakenteeseen ja ATP:n toisen liittymiskohdan hydrolysointi. Tämän hydrolyysin avulla rakenteen dimeeri muodostetaan ja puretaan. NBD1:n aminohappo R555 ja NBD2:n aminohappo T1246 sijaitsevat toisen liittymiskohdan molemmilla puolilla. R555 ja T1246 pariutuvat energeettisesti vain, kun kanava on auki. NBD-dimeeri aukeaa osittain, mutta ei irtoa kokonaan toisistaan (Wang *et al.* 2014).

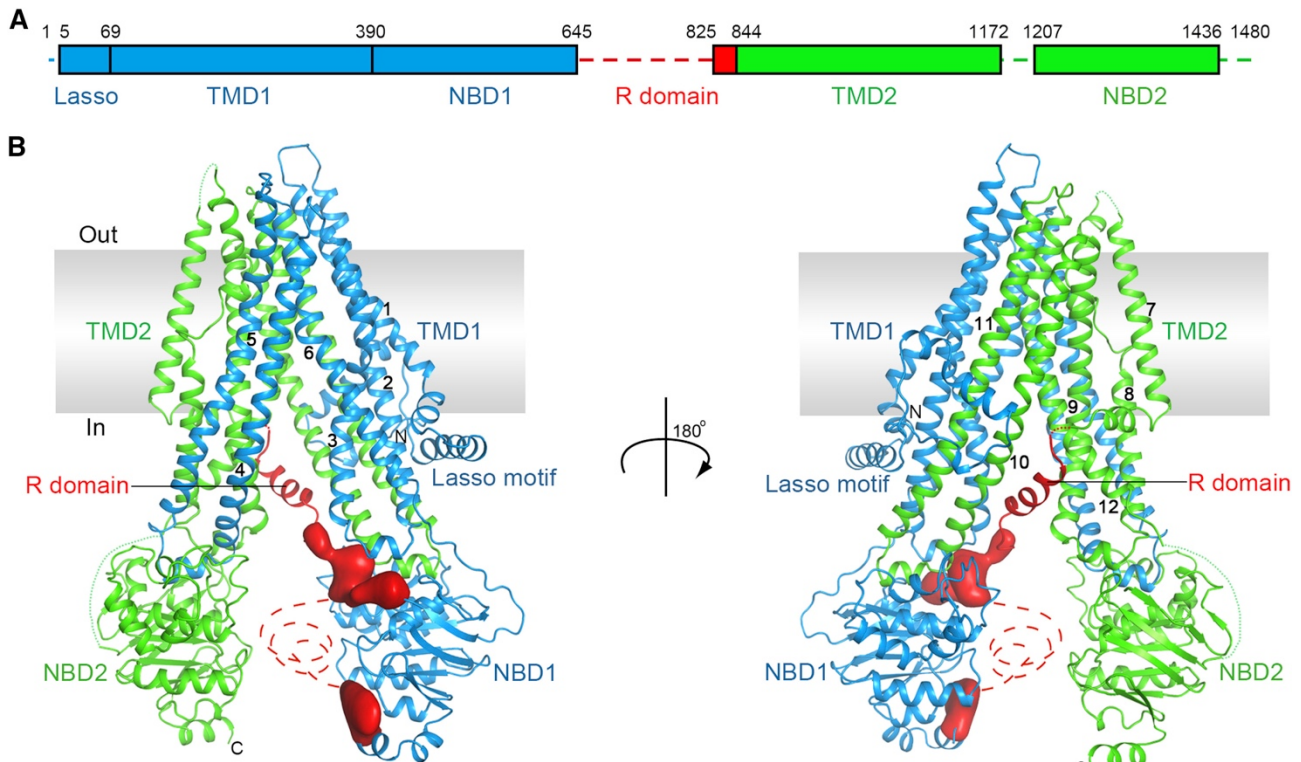
CFTR-kanava aukeaa, kun proteiinikinaasi A (PKA) fosforyloi R-domeenin ja ATP liittyy molempiin NBD domeeneihin. ATP:n hydrolyysi niiden liittymiskohdissa hajottaa NBD dimeeriin, joka johtaa kanavan sulkeutumiseen. CFTR-proteiinin rakenteesta tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin kahden CFTR-kanavan rakenne, kun kanava on suljettu. Seeprakalan CFTR-proteiinin on vain 55-prosenttisesti identtinen, mutta niiden suljetut konformaatiot ovat lähes samanlaiset. Uusi tutkimus osoittaa miten seeprakalan CFTR-proteiinin konformaatio muuttuu, kun ATP liittyy siihen (Kuva 3) (Zhang *et al.* 2017).



Kuva 3 Seeparakalan CFTR-proteiini A: zCFTR-proteiinin rakenne ilman ATP:ta (defosforyloitu) ja ATP liittyneenä rakenteeseen (fosforyloitu), B: Suljettu ja avoinna oleva CFTR-kanavan rakenne, C: Suljetun ja avoinna olevan CFTR-kanavan NBD1 ja NBD2 domeenit, D: Rakenne jos, konformaation muutosta ei tapahtuisi. Tällöin CFTR-kanava olisi avoinna oleva huokonen (Zhang et al. 2017).

Toinen tutkimus selvitti ihmisen CFTR-proteiinin rakenteen elektronimikroskoopin avulla. Kokonaisrakenteen resoluutio on 3,9 Å:ta. Muodostetussa rakenteessa mukana ovat lassomotiivi, TMD1, TMD2, NBD1, NBD2 ja polyalaniinimalli aminohapoista 825-843. Suljettu CFTR-kanava muistuttaa tyypillistä ABC-kuljettajaa. Ulomman osan 12 TM-heeliksiä ovat tiukasti asettautuneet lähelle toisiinsa. Sisäosassa TMD jakaantuu kahteen osaan, jotka ulottuvat noin 30 Å:n verran sytoplasmiaan.

Syttoplasmassa kaksi NBD on kiinni TM-heelikseissä. R-domeeni on molekyylin kahden puoliskon välissä (Kuva 4) (Liu *et al.* 2017).



Kuva 4 Ihmisen CFTR-proteiinin defosforyloiturakenne A: Domeenien järjestys CFTR-proteiinissa, B: Rakennekuva CFTR-proteiinista kahdesta suunnasta (R-domeenin rakenteen resoluution on heikempi kuin muun rakenteen, katkoviivat merkitsevät niitä osia, joiden rakennetta ei ole selvitetty) (Liu *et al.* 2017).

CFTR-proteiinin ekspressio on monimutkainen prosessi, johon liittyy monia transkription aloituskohtia, jotka ovat kudosspesifisiä. Lisäksi prosessissa mukana on vaihtoehtoisia ensimmäisiä aloitus eksoneita ja siitä johtuen myös vaihtoehtoisesti silmukoituja erilaisia transkripteja. Lisäksi on löydetty monia erilaisia säätelytekijöitä ja elementtejä, jotka ovat tärkeässä osassa CFTR:n geeniekspression säätelyä. Esimerkiksi suolistossa ihmisen CFTR-geenin ensimmäinen introni on vastuussa CFTR:n ekspressiosta. NK (Nuclear factor) transkriptiotekijän kB-elementti, joka sijaitsee 1103 emäsparin kohdalla, vaikuttaa interleukiini-1 β -signaalointiin sitomalla NK-kB:n. Tämä prosessi johtaa CFTR:n ekspression lisääntymiseen Calu-3-soluissa (Pranke & Sermet-Gaudelus 2014).

4 CFTR-mutaatiot

Suurin osa mutaatioista, jotka kohdistuvat CFTR-geeniin johtavat kystiseen fibroosiin. Tällä hetkellä tunnettuja CFTR-mutaatioita on noin 2000. Näistä mutaatioista suurin osa on erittäin harvinaisia, eivätkä kaikki aiheuta kystistä fibroosia (Bowen & Hull 2015). Noin 40 % näistä mutaatioista on

arvioitu aiheuttavan aminohapon substituution, noin 36 % mutaatioista on arvioitu muuttavan CFTR-RNA:n valmistusta johtaen muun muassa lukukehyksen muutokseen, RNA:n väärin silmukoituihin variantteihin ja nonsense-mutaatioon. 14 % mutaatioista on todettu olevan luonnollisia variantteja, 3 % mutaatioista vaikuttaa liittyvän CFTR:n rakenteen uudelleen järjestäytymiseen, 1 % näistä mutaatioista puolestaan vaikuttaa promootteri alueisiin. Noin 6 % tunnetuista mutaatioista kuuluu niihin mutaatioihin, joiden vaikutusta ei vielä ole pystytty selvittämään. Tunnetut mutaatiot, jotka aiheuttavat kystistä fibroosia vaikuttavat siten solukalvon CFTR-proteiinin määrää tai toimintaan tai jopa molempiin (Cutting 2015). Tiettyjä mutaatioita esiintyy enemmän tietyillä kansoilla ja alueilla, mutta yleisin mutaatio Euroopassa on F508del. Tunnetuista CFTR mutaatioista se kattaa noin 66 % Pohjois-Amerikan ja Euroopan mutaatioista (Bowen & Hull 2015).

Proteiinin väärinlaskostuminen johtaa kloridi-ionien kertymiseen solun sisälle. Prosessi johtaa natriumionien ja veden siirtymiseen elektrokemiallisen ja osmoottisen gradienttien mukaisesti. Tämä puolestaan johtaa hengityselimistön pinnan kuivumiseen. Paksua limaa kertyy kehoon, jolloin bakteerien kasvu lisääntyy ja aiheuttaa infektioita. Lisäksi on tehty tutkimuksia, joiden mukaan CFTR-mutaatiot aiheuttaisivat myös ongelmia luontaisen immunitetin kehittämisessä hengityselimistön osalta. CFTR-proteiinin kuljettama tiosyanaatti on keskeinen osa luontaisen immuunivasteen muodostumisessa. Kun tiosyanaatin kuljetus on heikentynyt tai estynyt kokonaan se voi estää luonnollisen immuunivasteen muodostumisen. Normaalissa tilanteessa tiosyanaatti reagoi hypotiosyanaatin kanssa muodostaen immuuni vasteen keuhkoissa tulehduksen aikana (Fraser-Pitt & O'Neil 2015).

4.1 CFTR-mutaatioiden luokittelu

Suurin osa CFTR-mutaatioista, jotka aiheuttavat kystistä fibroosia on luokiteltu sen mukaan, miten mutaatio vaikuttaa CFTR-proteiiniin. Tämän hetkiseen luokitteluun kuuluu kuusi luokkaa, joista homotsygoottiset I, II ja III luokan mutaatioista aiheutuva kystinen fibroosi on vakavampi kuin muiden luokkien mutaatioista aiheutuva kystinen fibroosi. Luokkien IV, V ja VI CFTR-mutaatioilla on jonkinlainen mahdollisesti joiltain osin heikentynyt, mutta ei kokonaan estynyt toiminta. Tästä syystä henkilöillä, joilla on näihin luokkiin kuuluva CFTR-mutaatio, on lievempi taudinkuva (Fraser-Pitt & O'Neil 2015). Kystistä fibroosia sairastavan henkilön genotyypin ja fenotyypin yhteys on hankala määrittää tarkasti. Kuvasta voidaan nähdä kaikki mutaatioiden luokat, kunkin luokan tyypillisimmät mutaatiot, sekä eri mutaatiotyypit (Bowen & Hull 2015).

CFTR gene mutation class	Mutation type & resulting CFTR protein defect	Amount of functional CFTR at apical membrane	Examples
I	Non-sense and splicing mutations lead to truncated, deleted or elongated protein variants that are unstable	None	Trp1282X Gly542X711+1G→T
II	In-frame insertions and deletions lead to mis-folded CFTR protein that does not reach the apical cell membrane	None (or very little)	Phe508del Asn1303Lys Gly85Glu
III	Mis-sense mutations cause gating problems with signalling failure at NBDs preventing CFTR channel opening	None (not functional)	Gly551Asp Ser492Phe Val520Phe
IV	Abnormal conformation of MSDs leads to poor chloride channel conductivity	Reduced	Arg117His R334W R347H
V	Aberrant splicing, promotor mutations or inefficient trafficking lead to reduced amounts of functional CFTR protein at the apical membrane	Reduced	3849+10kbC>T A455E
VI	Non-sense and frame-shift mutations cause instability of functional CFTR with reduced half life at the apical membrane	Reduced	Gln1412X 4326delTC 4279insA

Kuva 5 Kystistä fibroosia aiheuttavien mutaatioiden luokittelu. Ensimmäiseen luokkaan kuuluu biosynteesiä estävät mutaatiot, joita ovat esimerkiksi Trp1282X ja Gly542X711+1G→T. Toiseen luokkaan kuuluvat mutaatiot, jotka aiheuttavat CFTR-proteiinin viallisen prosessoinnin ja laskostumisen, kuten F508del. Kolmannen luokan mutaatiot ovat niin sanottuja CFTR-kanavan portin rakenteen toiminnan estäviä mutaatioita, niihin kuuluu muun muassa G551D. Neljännen luokan mutaatiot aiheuttavat CFTR-proteiinin väärinlaskostumisen. Tähän luokkaan kuuluu muun muassa R334W ja R347H. Viidennen luokan mutaatiot aiheuttavat proteiinin silmukointi virheitä. Kuudennen luokan mutaatiot johtavat epästabiiliin CFTR-proteiinin muodostumiseen, johtaen sen ennen aikaiseen hajotukseen (Bowen & Hull 2015).

Ensimmäiseen luokkaan kuuluu CFTR-proteiini biosynteesiä estävät mutaatiot. Tällaisia mutaatioita ovat silmukointi virheet, lukukehystä muuttavat mutaatiot ja nonsense-mutaatio. Nonsense-mutaatio aiheuttaa proteiinin muodostuksessa ennen aikaisen lopetuksen. Proteiinin muodostus pysähtyy liian aikaisin, koska yhden nukleotidin muutos vaihtaa alkuperäisen kodonin lopetuskodoniksi. Tästä syystä translaatio pysähtyy liian aikaisin, joka puolestaan kiihdyttää mRNA:n hajoamista rappeuttamalla muodostuneen nonsense-proteiinin. Tämä tapahtumaketju johtaa siihen, että CFTR-proteiinia ei ole yhtään tai sitä on erittäin vähän solukalvolla. Yleinen ensimmäisen luokan mutaatio on G542X, joka on toiseksi yleisin kystistä fibroosia aiheuttava mutaatio. G542X on yleinen erityisesti

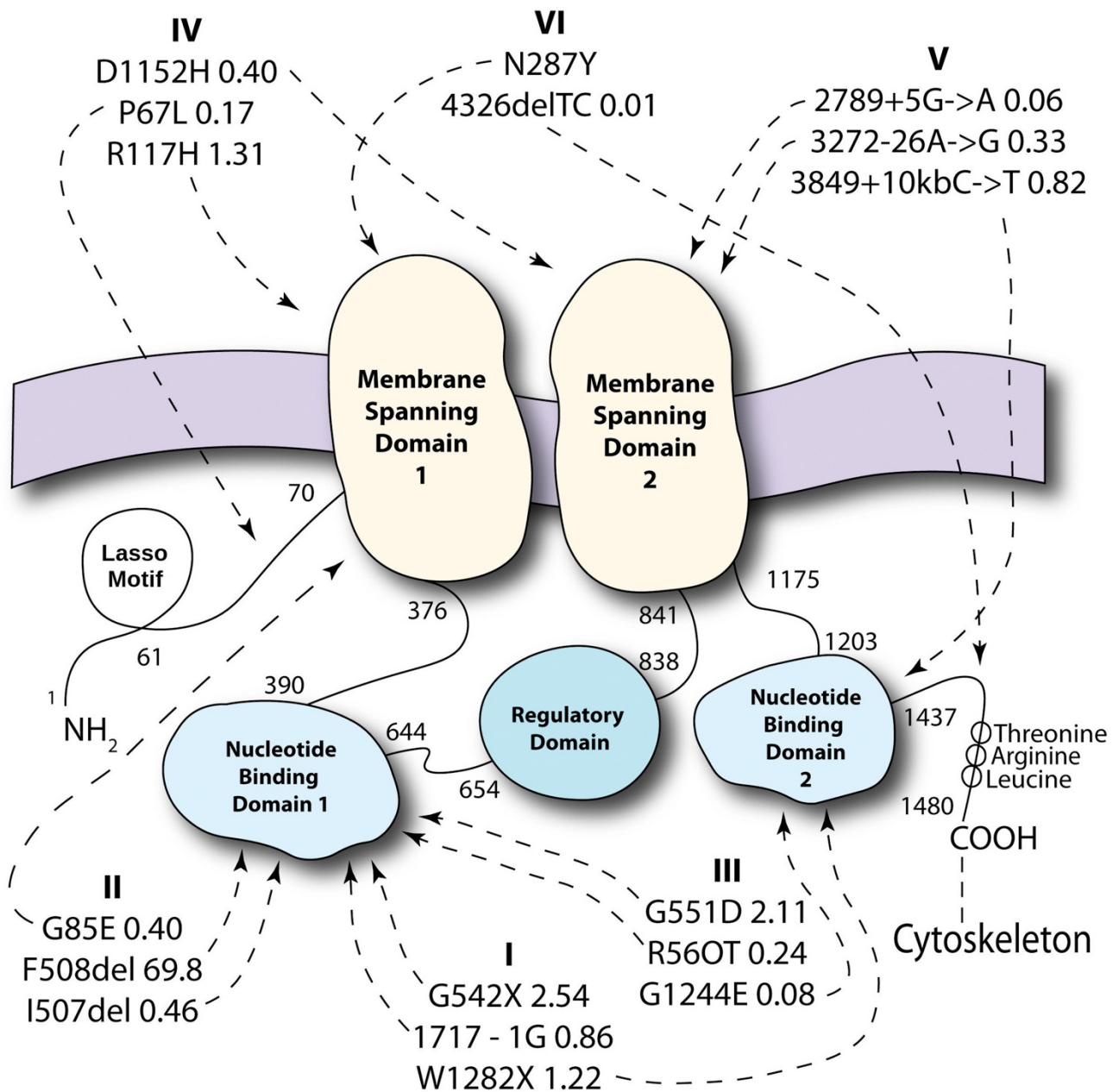
Välimeren alueen maissa. W1282X on puolestaan yleinen mutaatio ashkenazi juutalaisilla (Wang *et al.* 2014).

Toiseen luokkaan kuuluu mutaatiot, jotka aiheuttavat CFTR-proteiinin viallisen prosessoinnin ja laskostumisen. Tästä syystä solukalvolla ei ole toimivaa CFTR-proteiinia, vaikka proteiinin translaatio tapahtuu kokonaan. Yleisin tähän luokkaan kuuluva mutaatio on F508del, joka sijaitsee proteiinin NBD1:n rakenteessa (Wang *et al.* 2014). F508del on lukukehystä muuttava kolmen emäksen deleetio, jossa fenyylialaniini aminohappo poistuu koodatusta proteiinista kohdassa 508 (Bowen & Hull 2015). Fenyylialaniini poistuu CFTR-proteiinin NBD1:stä, joka aiheuttaa proteiinin väärin laskostumisen (Wang *et al.* 2014). Lisäksi mutaatio häiritsee TMD2:n olevan neljännen solusisäisen kierteen yhteyttä TMD1:n kanssa (Patrick & Thomas 2012). F508del mutaatiosta johtuen proteiini laskostuu väärin. Endoplasmakalvoston laatu kontrolloi järjestelmä tunnistaa väärin laskostuneen CFTR-proteiinin, jonka jälkeen se merkataan ubikitiinilla. Merkattu proteiini hajotetaan sen jälkeen proteasomissa. Nykyisten tutkimusten mukaan on todettu, että osa F508del CFTR-proteiinista on ekspressoituna solukalvolla. Solukalvolle päässeet F508del-mutatoituneet CFTR-proteiinit ovat rakenteellisesti epävakaita ja niiden huokosen avautumisessa on ongelmia, jolloin kloridi ionien kuljetus solukalvon läpi on heikentynyt merkittävästi (Wang *et al.* 2014).

CFTR-villityyppi proteiinia kuljetetaan ja hajotetaan proteasomissa pienissä määrin mutatoituneen proteiinin tavoin. Tällöin tietty osa tuotetusta proteiinista päätyy solukalvolle, jolloin normaali kloridi-ionien kuljetus on mahdollista. Mutatoituneen F508del CFTR-proteiinin nopean hajoamisen keskeisessä osassa ovatkin ubikinaation ja proteasomaalinen hajotus. Merkatun proteiinin tunnistamisessa keskeisessä osassa ovat ubikitiinimolekyylit, jotka ovat kovalenttisesti kiinnittyneet Lys48:aan. Yhtenä hoitokeinona toisen luokan mutaatioiden hoitamiseen on tutkittu lääkkeitä, jotka estäisivät polyubikitinaation. Oikeaan konformaatioon laskostumista voisi edelleen avustaa lääkkeiden avulla, jolloin edes osa proteiini toiminnasta pystyttäisiin palauttamaan (Fraser-Pitt & O'Neil 2015).

Kolmanteen mutaatioluokkaan kuuluvat mutaatiot aiheuttavat ongelmia CFTR-proteiinin portin toiminnassa, jotka johtavat usein vakavampaan KF:n muotoon. Näissä mutaatioissa CFTR-proteiini prosessoidaan ja kuljetetaan oikein solukalvolle. Se on riittävän stabiilissa muodossa toimiakseen ja lisäksi sen Cl⁻-kanavien läpäisevyydessä ei varsinaisesti ole ongelmia (Wang *et al.* 2014). Tämä tarkoittaa, että ATP:stä riippuvaisen kanavan portittuminen poistetaan, joka johtaa siihen, että kanava on suljetussa muodossa. Yleisin kolmanteen luokkaan kuuluva mutaatio on G551D missense-

mutaatio, joissa pooliton ja varaukseton aminohappo (glysiini) vaihtuu negatiivisesti varautuneeseen aminohappoon (asparagiinihappo) (Fraser-Pitt & O'Neil 2015). Mutaatio sijaitsee NBD1:ssä, joka tutkimusten mukaan on keskeinen aminohappo toisessa ATP:tä sitovassa kohdassa LSGGQ-motivissa (Wang *et al.* 2014). Usein mutaatiot ovat sijoittuneet CFTR:n domeeneihin. Kuvassa on esitetty yleisimpiä mutaatioita ja niiden paikkoja CFTR:n rakenteessa (Liou 2019).



Kuva 6 CFTR-proteiinin domeeni-rakennetta kuvaava malli. Rakenteessa kuvattuna yleisimpiä mutaatioita, niiden luokat ja sijainnit. Amiinipäästä alkaen rakenteessa on lassomotiivi, TMD1 (aminohapot 70-376), johon on liittynyt NBD1 (aminohapot 391-644), R-domeeni (aminohapot 654-838), TMD2 (aminohapot 841-1175) ja NBD2 (aminohapot 1203-1437). Viimeisenä karboksyylipäässä NBD2:een liittyneenä on treoniini-arginiini-leusiinihantä (Liou 2019).

4.1.1 Luokittelun ongelmat

Luokittelun ongelmana on muun muassa se, että jopa sama genotyyppi voi johtaa erilaiseen taudin kulkuun. Fenotyyppiin vaikuttavia tekijöitä on kuitenkin monia, kuten ympäristötekijät, saasteet, terveydenhuollon saatavuus, modifioivat geenit ja vaihtelevuus CFTR-kanavan toiminnan välillä (McKone *et al.* 2015). Geneettisen analyysin tuloksena voidaan saada yleisiä KF:ää aiheuttavia mutaatioita, harvinaisia KF-mutaatioita tai kaksi harvinaista mutaatiota. Kaksi samalta vanhemmalta saatua CFTR-mutaatiota on cis ja kaksi mutaatiota eri vanhemmilta on trans. Jos kaksi mutaatiota on cis-asemassa, kystistä fibroosia ei ehkä voida diagnosoida. Tässä tilanteessa tulisi jatkaa geneettisten analyysien tekoa, jotta trans-asemassa oleva mutaatio löytyisi. CFTR-geenit, joilla on kaksi muutosta samassa kopiassa (cis) ovat niin sanottuja komplekseja alleeleja. Eniten tutkittuja komplekseja alleeleja ovat kahdeksannen intronin variantit, näitä ovat muun muassa TG13-T5, TG12-T5 ja TG11-T5. TG13-T5 ja TG12-T5 CFTR-geenit esiintyvät heterotsygoottisesti muiden KF-mutaatioiden kanssa ja aiheuttavat kystistä fibroosia tai sen lievempää muotoa. Kun taas TG11-T5 harvoin aiheuttaa kystistä fibroosia (Castellani *et al.* 2008).

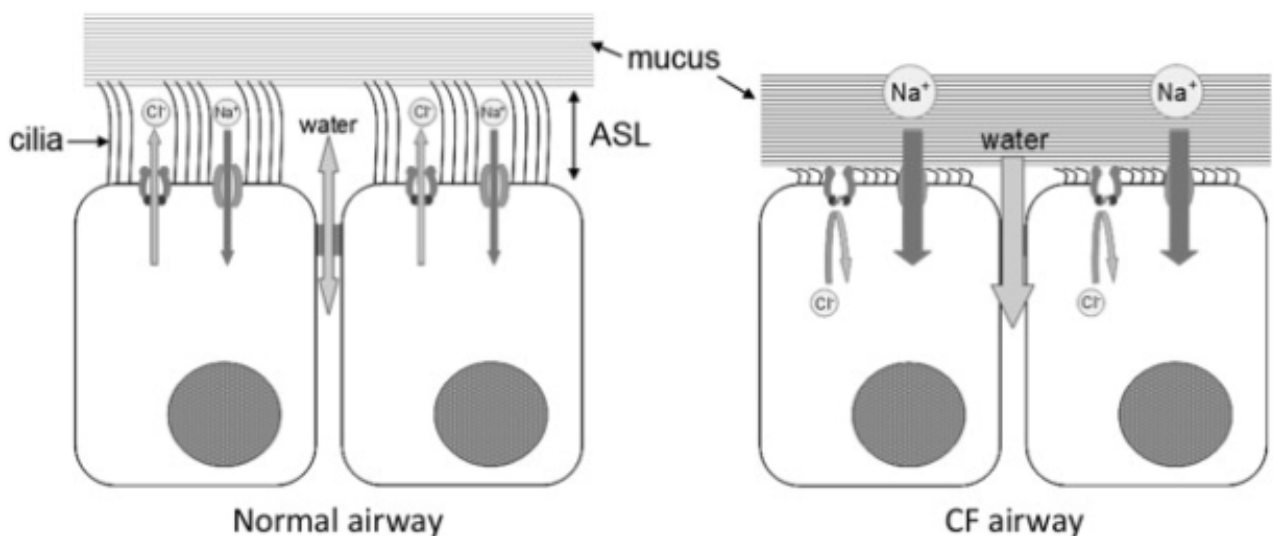
Kaikkien KF:ää sairastavien henkilöiden mutaatioita ei pystytä tunnistamaan. Syynä tähän voi olla se, että geneettiset testit eivät ole tarpeeksi kehittyneet. Kaikkia geenin alueita ei vielä pystytä selvittämään. Mutaatiot, jotka ovat esimerkiksi promootorialueella tai kauempana sijaitsevassa säätelysekvenssissä, eivät kuulu alueisiin, joita tutkittaisiin säännöllisesti. On myös olemassa todisteita siitä, että muut kuin CFTR-geenissä olevat mutaatiot voivat myös aiheuttaa KF:ää (Castellani *et al.* 2008).

5 Sairaudet ja oireet

CFTR-proteiini on ekspressoituna monissa eri kudoksissa. Pääasiallisesti sitä esiintyy kuitenkin epiteelisolujen ulkokalvolla: hengitysteiden pinnalla, limakalvon rauhasissa, haimakanavan epiteelissä, pohjukaissuolen submukoosassa, sappirakon epiteelissä, sappitiehdyssä, hikirauhasten epiteelissä, sylkirauhasten epiteelissä, kohdunkaulan ja kohdun epiteelissä sekä munuaistiehyiden epiteelissä. CFTR-proteiinin esiintyvyydellä näissä kudoksissa on suora yhteys kystisen fibroosin oireisiin ja niiden ilmenemiseen kudoksissa ja elimissä. Ainoana poikkeuksena on munuaiset, joissa muut reaktiiviset ovat toiminallisesti tärkeämpiä. CFTR-proteiinia esiintyy myös sydämen kammion soluissa, aortan sileissä soluissa, aivojen neuroneissa, verisuonten endoteelisoluissa ja lymfosyyteissä (Bowen & Hull 2015).

5.1 Hengitystie- ja keuhkosairaudet

Kystinen fibroosi vaikuttaa moniin elimiin ja aiheuttaa erilaisia terveyshaittoja, joista hengityselinsairaudet ovat yleensä vakavimpia ja ovat syynä potilaiden menehtymiseen. Hengityselimet ovat jatkuvassa kosketuksessa hengitysilman mukana tulevien myrkkyjen ja partikkeleiden kanssa, joilla on mahdollisuus vahingoittaa keuhkoja ja muuta hengityselimistöä. Hengityselimistössä tärkeä osa on sen epiteeli, joka toimii mekaanisena, immunologisena ja kemiallisena esteenä muodostaen osan kehon immuuni vasteesta. Lisäksi se toimii osana hankitun immunitetin muodostumista. Hengitysteiden epiteeli muodostuu värekarvallisista- ja erityssoluista, joiden pinnalla on proteiineja sisältävä nestekerros. Tässä nestekerroksessa on kaksi osaa: alhaisempi viskositeetti kerros, jossa värekarvat voivat liikkua vapaasti ja päällekkäinen kerros, johon hengityksen mukana kulkeutuvat partikkelit ja patogeenit tarttuvat. Värekarvat kuljettavat tässä kerroksessa partikkeleita ja patogeeneja kurkun päähän, jossa ne voidaan yskiä pois. CFTR-kanava ja epiteelin natriumkanava (ENaC) ovat tutkimusten mukaan tärkeimpiä osia hengitysteiden pinnan nestetasapainon säätelyssä. Säätely tapahtuu osmoottisen gradientin kautta, joka muodostuu, kun kloridia ja natriumia kuljetetaan kanavien läpi ulkokalvolle. Heikentynyt tai kokonaan puuttuva kloridikanavan toiminta heikentää pinnalla olevan nesteen osmoottista gradienttia. Tämä johtaa siihen, että hengitysteiden pintojen patogeeminen puhdistaminen heikentyy huomattavasti. Paksun limaeritteen kertyminen hengitysteihin johtaa kystisen fibroosin tyypillisimpiin keuhko- ja hengityselimistön oireisiin. Paksu lima jää lähemmäksi hengitysteiden epiteelisoluja, mikä voi aiheuttaa hypoksisten alueiden muodostumista ja jopa johtaa bakteerien lisääntymiseen hengitysteiden alueella (Kuva 7) (Bowen & Hull 2015).



Kuva 7 Keuhkojen epiteeli terveellä henkilöllä ja kystistä fibroosia sairastavalla henkilöllä. Terveellä henkilöllä limakerros hengitysteiden epiteelin pinnalla on liukoisempaa, ja se liikkuu värekarvojen pinnalla. KF:stä johtuen limakerros paksuuntuu ja tarttuu hengitysteiden epiteelin pintaan (Bowen & Hull 2015).

Myös kystisestä fibroosista johtuvan epänormaalin immuunivasteen on ajateltu olevan yhtenä syynä keuhko- ja hengitysteiden oireisiin. Immuunivasteen epänormaali säätely lisää keuhkosairauksien patogeenistä epätasapainoa pro- ja anti-tulehdustekijöiden kautta. Tämä johtaa siihen, että bakteerien eliminointi hengityselimistön alueella heikentyy. Hengitysteiden pinnalla olevassa nestekerroksessa on ajateltu olevan vähemmän antimikrobisia aineita ja lisäksi fagosytoosi on vähentynyt. Eläimkokeissa sialla on havaittu olevan muutoksia hengitysteiden nesteen pH-arvossa verrattuna villityyppiin. Bakteri-infektio hengitysteissä johtaa neutrofiiliseen tulehdukseen ja kudოსvaurioihin, jotka edelleen edistävät hengitysteiden tukkeutumista ja heikentävät potilaan immuunijärjestelmää. Keuhko- ja hengityselin oireet alkavat jo lapsuudessa, josta aikuisuudessa voi kehittyä vakava krooninen keuhkoputkentulehdus. Lisäksi muita mahdollisia oireita voivat olla heikentynyt kaasujen vaihto keuhkorakkuloissa ja vakavat hengitysvaikeudet. Tyypillisesti aikaisia oireita on havaittavissa jo varhaislapsuudessa. Oireet esiintyvät vaiheittain ja ennen pitkää oireet muuttuvat pysyviksi. Vähitellen heikentynyt toiminta johtaa peruttamattomiin keuhkovaurioihin. Oireiden kehittyminen ja alkaminen vaihtelee kuitenkin suuresti potilaiden välillä. *Staphylococcus aureus* ja *Haemophilus influenza* ovat varhaislapsuudessa esiintyviä hengitysteiden patogeeneja kystistä fibroosia sairastavilla lapsilla. Myöhemmin lapsuudessa *P. Aeruginosa* on yleisin patogeeni. Krooniseen *Pseudomonas* infektion kehittyminen yhdistetään kystisessä fibroosissa nopea keuhkojen toiminnan heikentyminen ja siitä aiheutuva heikentynyt elinkyky. KF:n kehittymiseen ja keuhko-oireiden seurauksiin vaikuttavat myös muut patogeenit kuten: *Stenotrophomonas maltophilia*, *non-tuberculous mycobacteria* and *Burkholderia cepacia complex* (Bowen & Hull 2015).

Tutkimuksen mukaan niillä kystistä fibroosia sairastavilla henkilöillä, joilla on keuhkosairaus, omaavat poikkeavan mikrobiomin. Erityisesti virulenssi tekijöiden epätasapaino antibioottiresistensseissä geeneissä on todettu. Eri mikrobiomin geenien tunnistaminen on erityisen tärkeää, jotta voidaan kehittää uusia biomarkkereita kystisen fibroosin tutkimiseen. Toisaalta mikrobiomin muutosten ymmärtäminen on tärkeää hengitysteiden tulehdusten hoidon kannalta. Myös erilaisten genotyyppien ja fenotyyppien yhdistäminen poikkeavien hengitysteiden mikrobiomin kannalta on tärkeää, koska se mahdollistaisi tehokkaampien henkilökohtaisten lääkehoitojen kehityksen (Bacci *et al.* 2017).

5.2 Haiman oireet ja sairaudet

Eksokriinisen haiman akinaariset solut tuottavat ruuansulatusentsyymien esiasteista, jotka kulkeutuvat kohti ohutsuolta, jossa niiden aktivoituminen tapahtuu. CFTR-kanava säätelee haiman tiehyiden apikaalisella pinnalla kloridi- ja bikarbonaatti-ionien erittymistä, joka johtaa osmoottisen gradientin

muodostumiseen. Muodostuva alkalinen neste on riittävän liukoinen huuhtoakseen ruuansulatusentsyymit suolistoon. Kystinen fibroosi aiheuttaa näiden toimintojen heikentymistä. Muodostunut neste paksuuntuu ja täten estää haiman ruuansulatusentsyymien pääsyn suolistoon. Lisäksi myös heikentynyt vetykarbonaattien kulkeutuminen ehkäisee happaman ruokasulan neutraloitumista ja edelleen vaikeuttaen ruoansulatusta ja sen imeytymistä. Suuri osa KF:ää sairastavista henkilöistä kärsii maksan vajaatoiminnasta. Tämä johtaa siihen, että proteiinit ja rasva eivät imeydy kunnolla. Ravintoaineiden heikentynyt sulatus ja imeytyminen johtavat ravitsemustilan huononemiseen ja laihtumiseen. Kystisen fibroosin ongelmia ovat myös akuutti- ja krooninen haimatulehdus. Tulehduksia esiintyy harvemmin henkilöillä, joilla on mahdollisesti lievempi KF:n muoto. Haiman vaurioituminen saattaa myös johtaa insuliinia erittävien solujen vaurioitumiseen. Heikentynyt insuliinin erityys voi johtaa kystisestä fibroosista aiheutuvaan diabetekseen (CFRD) (Bowen & Hull 2015).

5.3 Ruoansulatuskanavan oireet

Suolistossa on useita toisiinsa liittyviä reittejä, joiden tehtävänä on säädellä natriumin ja kloridin liikettä suolen epiteelipinnan läpi. Nämä tapahtumat ylläpitävät nesteiden homeostaasia ja edistävät ravinteiden imeytymistä. Yksi näistä reiteistä ohjaa kloridin erittymistä suolen lumeeniin CFTR-kanavan kautta. Reitin aktivoiminen estää natriumkloridin imeytymistä ja vähentää natriumista riippuvaista ravinteiden imeytymistä. Kystinen fibroosi puolestaan vähentää kloridin eritystä suolen lumeeniin, jolloin lisääntynyt veden ja natriumin imeytyminen johtaa suolen lumeenin kuivumiseen ja happamoitumiseen. Lisäksi vähentynyt kloridin erityys suolen lumeeniin heikentää edelleen myös ravintoaineiden imeytymistä. Lisääntynyt epänormaalin viskoosin suolilima ja siitä syystä heikentynyt limaoirteen kuljetus altistaa suoliston mikrobiomin muutoksiin. Kystisessä fibroosissa suoliston mikrobiomi lisääntyy ja monipuolisuus häviää. Tämä voi aiheuttaa ohutsuolen bakteerien liikakasvua aiheuttaen kroonisia tulehduksia, sekä heikentyneeseen immuunivasteeseen suolistossa. Kystistä fibroosia sairastavilla vastasyntyneillä lapsilla voi esiintyä suolitukos. Noin 20 % KF-diagnoosin saaneista lapsista kärsii suolitukoksesta. Nuorilla ja aikuisilla esiintyy ohutsuolen tukkeutumista, joka aiheutuu paksun limaoirteen kertymisestä suolistoon. Pahimmassa tapauksessa tämä voi aiheuttaa suolen tukkeutumisen kokonaan (Bowen & Hull 2015).

5.4 Maksan- ja sappijärjestelmän oireet

CFTR-kanavia on myös kolangiosyyttien apikaalisella pinnalla, joita sijaitsee maksan sisä- ja ulkopuolisissa sappitiehyissä ja sappirakossa. Kystisestä fibroosista aiheutunut limaoirteen paksuuntuminen voi aiheuttaa niin ikään tukoksia sappitiehyissä. Vastasyntyneillä saattaa esiintyä kolestaasia,

jossa sappea ei pääse erittymään maksasta suolistoon. Kolestaasi ja konjugoitu hyperbilirunemia ovat viitteitä vastasyntyneen lapsen suolitukoksesta. Useissa tapauksissa kolestaasin syynä on jokin muu kuin kystinen fibroosi. Vastasyntyneiden kolestaasia ja hikitestiä tulisi kuitenkin käyttää hyödyksi kystisen fibroosin diagnoosia muodostettaessa. Maksansisäisten sappitiehyiden tukkeutuminen voi johtaa maksasolujen vaurioitumiseen. Ongelmia voivat aiheuttaa maksalle myrkyllisten aineiden kertyminen, oksidatiivinen stressi ja sytokiinin vapautuminen. Ongelmien kasautuminen johtaa usein kystiseen fibroosiin liittyvään maksasairauteen, joka puolestaan johtaa maksakirroosiin ja mahdollisesti portaaliinhypertensioon. Noin 27-35 % kystistä fibroosia sairastavista ihmisistä kärsii kehittyneestä KF:ään liittyvästä maksasairaudesta. Maksasairauden vakavuus vaihtelee suuresti potilaiden välillä. Genotyypin ja fenotyypin yhteys maksasairauden, ja sen kehittymiseen on tällä hetkellä melko heikko. Yhtenä ongelmana genotyypin ja fenotyypin yhteyden löytämisessä mahdollisesti on modifioivat geenit (Bowen & Hull 2015).

Noin 75 % kystistä fibroosia sairastavista henkilöistä kärsii rasvamaksasta, jonka uskotaan olevan suoraan seurausta CFTR-kanavan toimintahäiriöistä. Toisaalta esimerkiksi rasvahappojen, hivenainesten ja mineraalien puute on todennäköisempi syy rasvamaksan muodostumiselle. Kystistä fibroosia sairastavien henkilöiden ravinnonhallinnan avulla nuoruudessa kehittyvä rasvamaksa on vähentynyt huomattavasti. Nykyään kehittyvä rasvamaksa on suhteellisen hyvälaatuinen, eikä yleensä johda maksakirroosiin. Maksan lisäksi kystisestä fibroosista aiheutuvia ongelmia ovat myös sappikivitauti ja sappirakontulehdus. Näiden komplikaatioiden syynä uskotaan olevan tulehdus sappirakon sisällä. Lisäksi mahdollisena syynä on heikentynyt sapen virtaus, joka johtuu sen paksummasta koostumuksesta. Sappikiviä kehittyy noin 12-24 %:lle KF-diagnoosin saaneista henkilöistä (Bowen & Hull 2015).

5.5 Muut oireet

CFTR-kanavia sijaitsee kaikkialla munuaisen nefronin osissa. Munuaisten toimintahäiriöt eivät kuitenkaan ole kystisen fibroosin keskeisimpiä oireita. KF:n aiheuttamat toimintahäiriöt munuaisissa ovat hyperkalsemian aiheuttama munuaissairaus, munuaisallaskivien muodostuminen, bergerin tauti ja munuaisten amyloidoosi. CFTR-kanavan häiriön suorista ja epäsuorista vaikutuksista munuaisten oireisiin ei ole riittävästi tutkimusta. Muita komplikaatioita ovat muun muassa sinussolmukkeen toimintahäiriöt, ja polyypin muodostuminen nenään. Polyypit ovat hyvin yleisiä kystistä fibroosia sairastavilla henkilöillä, ja niiden uskotaankin liittyvät paksun liman aiheuttamiin infektioihin. Lap-suudessa kehittyvä osteoporoosi johtuu monista eri tekijöistä, kuten sekundaarisista vaikutuksista.

Näitä ovat muun muassa kystisestä fibroosista aiheutuva aliravitsemus, ravintoaineiden heikentynyt imeytyminen, D-vitamiinin puutos, viivästynyt murrosikä, testosteronin puutos miehillä, sekä erilaiset tulehdustilat. Sekundaaristen vaikutusten lisäksi CFTR-kanavan häiriöillä on suora vaikutus osteoplasteihin (Bowen & Hull 2015).

Kystinen fibroosi aiheuttaa hedelmättömyyttä, ja noin 98 % sairastuneista miehistä on täysin hedelmättömiä. Keskeisimpänä syynä miesten hedelmättömyyteen on siemenjohtimen epänormaali kehitys. Lisäksi syynä on CFTR-kanavan heikentynyt tai kokonaan puuttuva kyky kuljettaa vetykarbonaattia siittiöiden pinnalla. Tästä syystä siittiöiden kyky hedelmöittää munasolu on heikentynyt. Naisilla puolestaan heikentynyt hedelmällisyys johtuu pääasiassa huonosta terveydentilasta, aliravitsemuksesta, tai kystiseen fibroosiin liittyvästä diabeteksestä. Lisäksi CFTR-kanavan toimintahäiriöt voivat suoraan vaikuttaa kohdunkaulan lisääntyneeseen paksuun limakerrokseen, mikä rajoittaa siemennesteen kulkua (Bowen & Hull 2015).

6 Diagnoosi

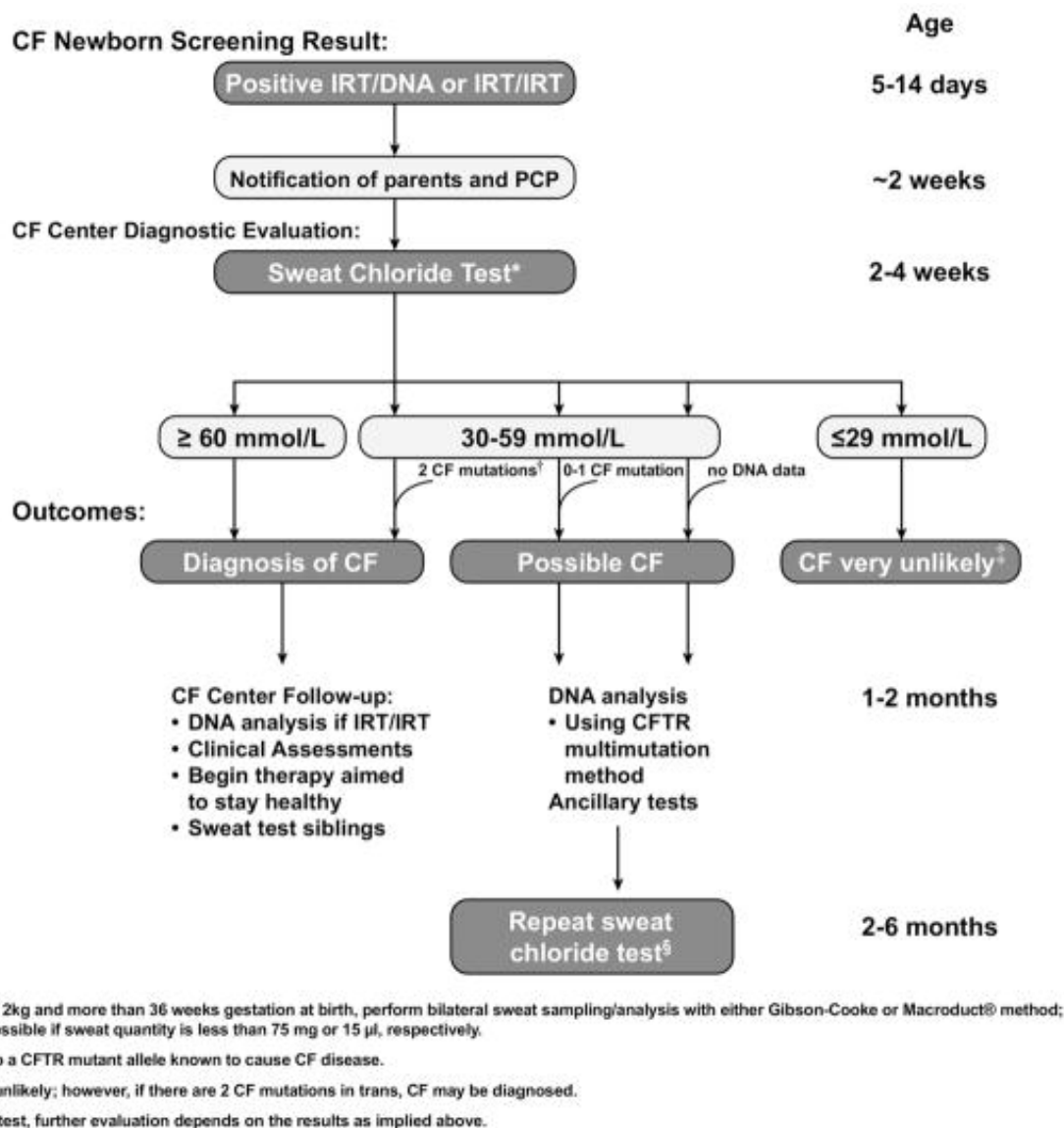
Kystisen fibroosin diagnosointi heti syntymän jälkeen on tärkeä osa oikeanlaisen hoidon saamista riittävän ajoissa. Aikainen diagnosointi vähentää sairaudesta aiheutuvien oireiden etenemistä, ja mahdollisesti siten myös pidentää potilaiden elinikää. Keskeisessä osassa diagnosointia on vastasyntyneille suoritettava Newborn screening (NBS) (Fraser-Pitt & O'Neil 2015). Diagnoosin muodostuminen ja kystisen fibroosin toteaminen on moniosainen prosessi, joka auttaa muodostamaan kokonaiskuvan taudin vakavuudesta ja sen kehittymisestä. Suurimmassa osassa tapauksista KF diagnosoidaan lähes välittömästi syntymän jälkeen NBS:n avulla. Diagnosointi, joka tapahtuu myöhemmin aikuisuudessa antaa viitteitä miedommasta taudin muodosta. Onkin tutkittu, että taudin kehittyminen on erilainen, jos diagnoosi on tehty jo lapsuudessa verrattuna aikuisuudessa tehtyyn diagnoosiin (Bonadia *et al.* 2014). Kloridipitoisuuden määrittäminen hikinäytteestä on keskeinen menetelmä, jonka perusteella voidaan saada viitteitä siitä, onko vastasyntyneellä lapsella kystinen fibroosi. Tämän lisäksi tehdään usein myös genotyyppianalyysi, jossa selvitetään mahdollisia mutaatioita. Ongelman genotyyppianalyysissä on se, että yli 1500 CFTR-mutaatiota on tunnistettu, mutta näistä mutaatioista kaikki eivät kuitenkaan aiheuta kystistä fibroosia. Suurin osa diagnooseista tehdään kuitenkin tyypillisten oireiden perusteella. Näihin kuuluu muun muassa krooniset infektiot hengitysteissä, voimakas liman erityys, krooninen yskä, aliravitsemus, ja haimantulehdus. Noin 5-10 % tapauksista on vaikeammin diagnosoitavissa. Geneettiset tutkimukset eri mutaatioiden selvittämiseksi, ja niiden yhdistäminen eri populaatioihin ovat edistäneet diagnoosin tekemistä. Lisäksi genotyyppien ja fenotyyppien

välisen yhteyden tutkimus on edistänyt diagnoosin lisäksi myös hoitojen mahdollista kohdentamista ja yksilöllistämistä parhaan mahdollisen tuloksen saamiseksi (Farrell *et al.* 2008).

6.1 NBS

NBS:ssä diagnoosi muodostuu keskeisten oireiden sijaan immunoreaktiivisen trypsinogeenin (IRT) korkeista arvoista veressä. Mittaus suoritetaan, kun seulotaan vastasyntyneiden lasten kystiseen fibroosiin viittaavia tekijöitä. IRT-arvot vaihtelevat tyypillisesti jonkin verran, joten jokainen eri NBS-ohjelma määrittelee mitkä arvot ovat niin sanotusti ”korkeita arvoja”. Jos IRT-testissä todetaan ”korkeita arvoja” suoritetaan myös geneettinen testaus tunnettujen CFTR-mutaatioiden tunnistamiseksi (IRT/DNA-menetelmä). Toinen menetelmä on IRT-mittausten toistaminen uudestaan noin kahden viikon ikäiselle lapselle (IRT/IRT-menetelmä). Molempien menetelmien herkkyyssaste on noin 90-95 % ja molemmat menetelmät identifioivat vastasyntyneitä laaja-alaisesti. NBS:n avulla voidaan saada viitteitä kystisestä fibroosista, mutta diagnoosin varmistamiseksi tehdään kloridipitoisuuden määrittäminen hikinäytteestä (Kuva 8) (Farrell *et al.* 2008).

Hien kloridipitoisuuden määrittästä käytetään KF:n diagnosoimisessa. Korkeat pitoisuudet, jotka ylittävät 60 mmol/l ovat yleisesti merkinä kystisestä fibroosista. Potilailla, joilla on mutaatio molemmissa CFTR-geeneissä voi hien kloridipitoisuus kuitenkin jäädä alle 60 mmol/l. Nykyisten linjausten mukaan myös keskitasoiset arvot (Euroopassa 30-60 mmol/l) voivat olla merkinä KF:stä. Tähän kategoriaan kuuluvat tarvitsevat lisää testausta ennen varsinaista diagnoosia. Ennen hien korkeaa kloridipitoisuutta pidettiin merkinä vaikeasta taudinkuvasta. Tätä yhteyttä on selitetty sillä, erityyppiset mutaatiot aiheuttavat erilaisia muutoksia CFTR-proteiiniin. On kuitenkin tutkittu, että genotyypeillä ja kloridipitoisuudella ei ole varinaista yhteyttä. Kuitenkin sitä voidaan pitää yhtenä indikaattorina siitä, kuinka kystinen fibroosi mahdollisesti kehittyy (McKone *et al.* 2015).



Kuva 8 NBS-menetelmä vastasyntyneiden KF:n diagnosoimiseksi. Kaksi mahdollista NBS-menetelmää: IRT/IRT ja IRT/DNA. Jatko-tutkimuksena kloridipitoisuuden määrittäminen hikinäytteestä, jonka tuloksista yli 60 mmol/l arvot viittaavat kystiseen fibroosiin. 30-59 mmol/l arvot viittaavat mahdolliseen KF:ään ja alle 29 mmol/l olevat arvot viittaavat siihen, että henkilöllä ei ole KF:ää (Farrell et al. 2008).

6.2 Geneettinen diagnoosi

Geneettistä testausta käytetään silloin kun henkilöllä on todettu jotain viitteitä kystisestä fibroosista. Lisäksi myös mahdollisia kantajia seulotaan tarvittaessa diagnoosin muodostamiseksi. Nämä menetelmät kuuluvat usein myös NBS:ään. Näiden lisäksi nykyään valitaan tarvittavat mutaatiotyyppiin spesifiset lääkkeet. Lisäksi kantajaseulonnalla voidaan lisätä sairauden havaitsemisherkkyyttä mahdollisten syntyvien lapsien keskuudessa (Sosnay et al. 2013). Geneettisestä näkökulmasta katsottuna mutaatio on määritelty siten, että se on molekulaarinen muutos geenin DNA-sekvenssissä. Määritelmässä ei kuitenkaan huomioida sen vaikutusta sen koodaamaan proteiinin muodostumiseen ja mahdollisiin muutoksiin siinä. Mutaatio voi siis tästä näkökulmasta ajateltuna olla myös neutraali tai jopa

hyödyllinen Mutaatioiden lisäksi DNA-sekvensseissä esiintyy myös polymorfismia. CFTR-geenissä esiintyvä polymorfismilla on tutkittu olevan vaikutusta kystisen fibroosin vakavuuteen. Etenkin modifioivissa geneeissä esiintyvän polymorfismin on osoitettu lisäävän taudin vakavuutta (Castellani *et al.* 2008).

Mutaatiot voidaan edelleen luokitella myös taudinkuvan mukaan neljään eri kategoriaan. Kategoriaan A kuuluvat ne mutaatiot, jotka aiheuttavat kystistä fibroosia. Kategoriaan B kuuluvat ne mutaatiot, jotka aiheuttavat CFTR-proteiiniin liittyviä sairauksia (muuta kuin kystinen fibroosi). C-kategorian mutaatioilla ei ole tunnettuja terveyteen liittyviä seurauksia. D-kategoriaan kuuluvat mutaatioilla ei ole perusteltuja terveydellisiä seurauksia. A ja B ryhmillä voi olla päällekkäisyyttä. Joidenkin mutaatioiden oireet voivat olla tyypillisiä KF:ään liittyviä oireita, lukuun ottamatta tyypillisiä haiman oireita. Henkilöt, joilla on D1152H-mutaatio ja F508del-mutaatio voivat kärsiä voimakkaista hengitysteiden ongelmista. Samalla kyseisellä henkilöllä voi olla kuitenkin täysin oireeton haima. Näiden luokittelun kannalta monimutkaisten mutaatioiden fenotyyppi saattaa vaihdella suuresti henkilöiden välillä (Castellani *et al.* 2008).

6.3 Diagnoosin ongelmat

Kystisen fibroosin diagnoosi muodostetaan usein fenotyypin ja CFTR-kanavan toimintahäiriöstä viittaavien todisteiden, kuten esimerkiksi hiestä mitatun kloridipitoisuuden avulla. Toinen tapa on tehdä geneettinen testaus, jossa pyritään tunnistamaan KF:ää aiheuttavat mutaatiot kummassakin geenin kopiassa. Hien kloridipitoisuuden määrittäminen on muista uusista tavoista huolimatta silti standardi toimenpide diagnoosin määrittämisessä. Usein kloridipitoisuuden arvoja käytetään tukemaan muita havaintoja. Geneettinen analyysi puolestaan tukee muita havaintoja, joka hikinäytteen kloridipitoisuus on lähempänä normaalia arvoa (Castellani *et al.* 2008).

Taudin heterogeenisyys tuottaa ongelmia diagnoosin muodostamisessa, taudin vakavuuden arvioinnissa ja taudinkuvan arvioimisessa. Usein kystistä fibroosia sairastavat kärsivät monista hengitysteihin liittyvistä ongelmista. Usein hengityskoetta (FEV1) käytetään yhtenä tapana arvioida ja ennustaa taudin kehitystä. Taudinkuva voi poiketa suuresti henkilöiden välillä, vaikka heillä olisi CFTR:n suhteen sama genotyyppi. Tästä syystä on tutkittu, että geneettiset modifioijat vaikuttavat fenotyypin muodostumiseen. Tutkimuksen mukaan 20-vuotiaana suoritettu arvioitu hengityskokeiden (FEV1) tulosten antama arvio on tarkka menetelmä erotella vakavat tapaukset lievemmistä muodoista.

Hengityskokeiden tulosten vertailun avulla saadaan myös viitteitä geenimodifioijien vaikutuksesta KF:n vakavuuteen (Schluchter *et al.* 2006).

7 Hoito

Tällä hetkellä ei ole olemassa varsinaista parantavaa hoitoa kystiseen fibroosiin. Usein hoito kohdistuukin oireisiin, eikä niinkään varsinaiseen taudin aiheuttajaan. On kuitenkin olemassa useita mahdollisia hoitokeinoja riippuen sairauden aiheuttavasta mutaatiosta, potilaan oireista, iästä ja yleisestä terveydentilasta. Menestyneimpiin hoitokeinoihin kuuluu antibioottihoidot keuhkosairauksien osalta. Antibioottihoidot ovat pidentäneet elinikää ja parantanut potilaiden elämänlaatua. Hengitettyjen antibioottien, kuten tobramycin ja colistin käyttö on vähentänyt systeemisiä sivuvaikutuksia, joita seuraa antibioottien pitkäaikaisesta käytöstä. Monet kehitetyt hoitokeinot kohdistuvat hengitysteiden oireiden hoitoon, koska tulehdukset johtavat nopeasti keuhkojen toiminnan heikentymiseen. Keuhkojen vaurioituessa peruuttamattomasti ja laaja-alaisesti, vaihtoehtona voi olla kahdensuuntainen keuhkojen siirtoleikkaus. Luovutetuista elimistä on pulaa, ja leikkaus ei ole aina sopiva vaihtoehto kystistä fibroosia sairastavalle henkilölle. Ongelmia tuottavat lisäksi myös hylkimisreaktio, ja mahdollisesti myös leikkauksen jälkeinen elinikäinen hyljinnänestolääkitys. Siirto vaatii myös usein pitkäkestoisen antibioottihoidon, jotta välttyttäisiin mikrobien aiheuttamilta infektioilta (Fraser-Pitt & O'Neil 2015).

Uutena hoitomuotona on kehitetty modulaattoreita, jotka voivat tulevaisuudessa olla vastaus kystisen fibroosin hoitoon. Uudet lääkkeet ovat parantaneet KF:stä kärsivien ihmisten ennustetta huomattavasti. Potentiaattorit ovat yksi modulaattori tyyppi, jotka vaikuttavat CFTR-kanavan toimintaa. Tutkittuja vaikutuksia on havaittu niillä henkilöillä, joilla on G551D-mutaatio. Lisäksi siitä on ollut apua myös niille, joilla on vastaavanlaisia mutaatioita. Korrektorit ovat puolestaan CFTR-proteiinin muodostumista ja laskostumista korjaava modulaattori. Näiden modulaattorien vaikutus on kohdistunut yleisimpään F508del-mutaatioon. Uusimmat modulaattorit eli niin sanotut uudensukupolven korrektorit ovat puolestaan toimivat yhdessä muiden korrektorien kanssa. Tämä tutkimus johti kolmesta korrektorista (Ivacaftor, tezacaftor ja elexacaftor) muodostuvaan yhdistelmähoitoon (TCT). Tästä yhdistelmästä on ollut hyötyä niille, joilla on ainakin yksi kopio F508del-mutaatiosta (Joshi *et al.* 2019).

7.1 Geeniterapia

Vaikka antibioottihoidot yhdessä erilaisten hengitysteiden puhdistusmenetelmien ja oikeanlaisen ruokavalion kanssa ovat parantaneet kystistä fibroosia sairastavien henkilöiden elämänlaatua ja pidentäneet elinikää, liittyy näihin hoitomenetelmiin myös paljon ongelmia. Näitä ongelmia ovat muun muassa bakteerien antibioottiresistenssi, useasta lääkkeestä kasaantuvan toksisuuden vaikutus, lisäksi hoidot ovat hankalia ja aikaa vieviä. Hoitojen ongelmana on se, että ne ovat vain oireita lievittäviä toimenpiteitä, ei niinkään parantavia. Edelleen noin 90 % kystistä fibroosia sairastavista henkilöistä kuolee vakaviin keuhkovaurioihin ilman onnistunutta keuhkosiirrännäistä. Näistä syistä uusien hoitomenetelmien kehitykselle on tarvetta. Yhtenä mahdollisena hoitona on geeniterapia. Geeniterapia sopisi kystisen fibroosin hoitoon, koska kyseessä on sairaus, joka koskettaa yhtä geeniä. Lisäksi heterotsygoottiset geenit ovat pääasiassa terveitä, hengitystiet olisivat helposti saavutettavissa ja on todettu, että syntyessä keuhkot ovat täysin normaalit, vaikka olisi todettu kystistä fibroosia sairastavaksi. Hengitysteiden ongelmana geeniterapian kannalta on se, että niiden pinnalla olevan nestekerroksen on tarkoitus pitää vieraat partikkelit poissa elimistöstä. Lisäksi myös elimistön immuunivaste olisi ongelma esimerkiksi virusvektoria käytettäessä. Myös muita kuin virusvektoreita käytettäessä, myös usein käytetyssä plasmidi DNA:ssa on paljon metyloimattomia CpG dinukleotidejä. Ihmisen elimistössä tämä rakenne tunnistetaan vieraana rakenteena, joka saattaa johtaa immuuni järjestelmän aktivoitumiseen ja immuunivasteeseen (Burney & Davies 2012).

Geenin siirrossa DNA:n siirtotehokkuus on melko alhainen, joten siihen on kehitetty aineita avustamaan geenin kulkeutumista soluun tai tumaan. Nämä aineet ovat joko virusperäisiä tai ei-virusperäisiä, myös nanopartikkeleita käytetään geeninsiirrossa (Burney & Davies 2012). Geeninsiirron tehokkuuden on kuitenkin todettu olevan melko alhainen, koska virusvektoreiden vastaavat reseptorit sijaitsevat hengitysteiden epiteelin basolateraalaisella pinnalla ja kystisestä fibroosista aiheutuva limakerros epiteelin pinnalla on paksumpi kuin terveillä henkilöillä. Nämä tekijät aiheuttavat sen, että virusvektorien tunkeutuminen limakerroksen läpi on lähes mahdotonta. Lisäksi jatkuva hoito virusvektorien avulla elämänmittaisessa sairauden hoidossa on rajallista. On kuitenkin kehitelty vektoreita, jotka kykenevät ohittamaan ainakin osan näistä geeninsiirron ongelmista. Sendai virus (SeV) on todettu tehokkaaksi vektoriksi hengitysteiden geeninsiirrossa. SeV on yksijuosteinen Paramyxoviridae-perheeseen kuuluva virus. Sen avulla geeninsiirto hengitysteiden epiteeliin on tehokasta, koska siirtoon tarvittavat siaalihappo- ja kolesterolireseptorit ovat hengitysteiden epiteelisolujen apikaalisella pinnalla. Lisäksi geeninsiirtoa helpottaa se, että SeV ekspressoidaan sytosolissa, joten sen ei tarvitse läpäistä solun tumakalvoa. Ongelmaksi tässä tapauksessa kuitenkin muodostuu SeV:n käyttö

jatkuvana hoitona kystiseen fibroosiin. Ratkaisuna tähän voisi teorian tasolla olla kohdistettu kantasolujen transduktio. Tällöin yksittäinen hoitokerta riittäisi (Mitomo *et al.* 2010).

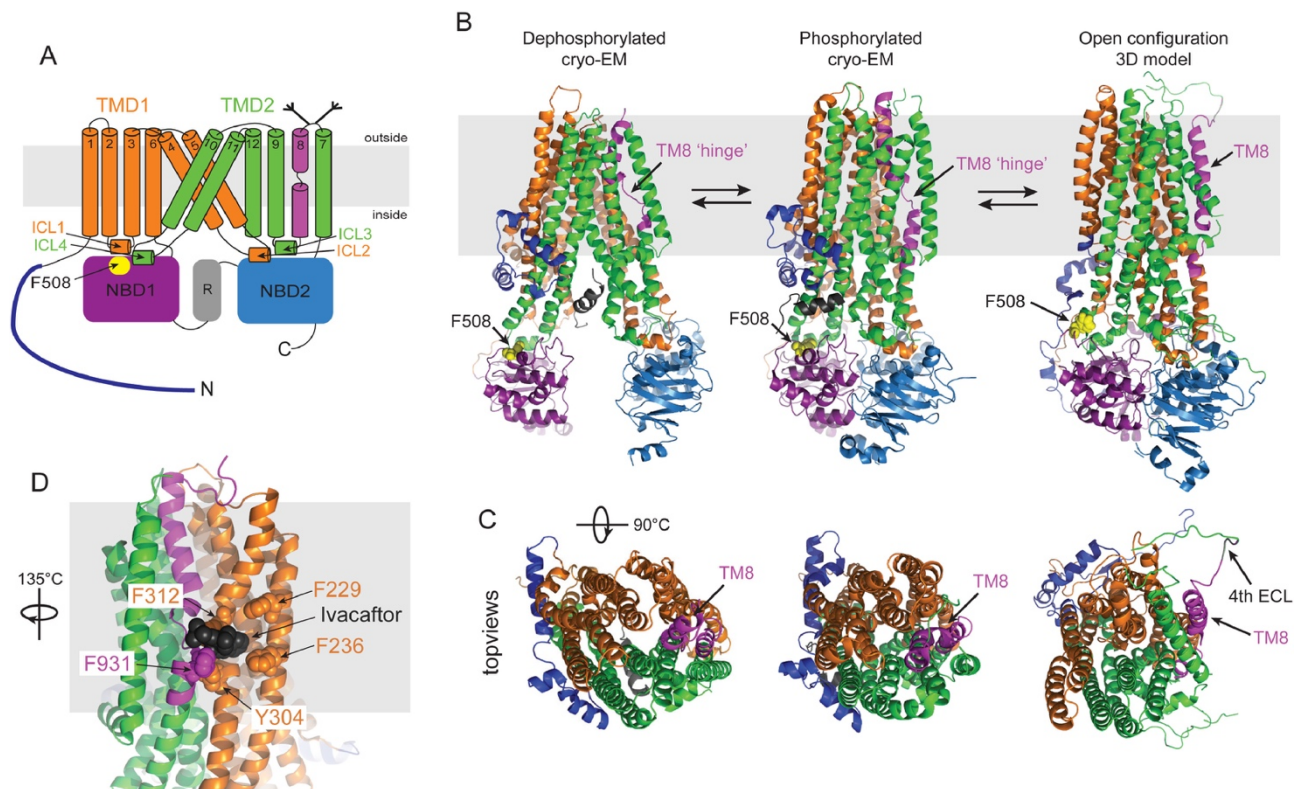
7.2 Ivacaftor/VX-770

Uutena hoitomuotona on kehitetty Ivacaftor/VX-770, jonka tarkoituksena on toimia hoitona kolmannen KF-luokan G551D-mutaatiossa. Lääkkeen on tutkittu parantavan keuhkojen toimintaa niillä henkilöillä, joilla on ainakin yksi G551D-mutatoitunut alleeli. On tutkittu, että Ivacaftor sitoisi CFTR-proteiinia ja muuttaa proteiinin säätelyä. Lääkkeen avulla kanava olisi avoimessa muodossa, jolloin osa sen toiminnasta saataisiin palautettua. Ivacaftorin kolmannen vaiheen lääkekokeissa on osoitettu, että hengityskokeen (FEV1) mitattu hengitystilavuus on lisääntynyt 10,7 % ja varsinaisen kokeen aikana tulokset ovat parantuneet 14,2 % (Fraser-Pitt & O'Neil 2015).

Modulaattorilääkkeillä on tyypillisesti vaikutusta myös harvinaisimmille CFTR-varianteille. Ivacaftor kehitettiin aluksi hoitona henkilöille, joilla on ainakin yksi G551D-mutatoitunut alleeli. Tällä hetkellä sen käytöstä hyötyy myös 37 muuta eri varianttia omaavaa henkilöä. Näiden varianttien joukossa on myös harvinaisempia mutaatiotyyppisiä, jotka eivät kuulu samaan luokkaan G551D-mutaation kanssa. Näitä ovat muun muassa E831X-mutaatio luokasta I, A455E-mutaation luokasta IV ja 2789 + 5G → A luokasta V. Lisäksi Ivacaftor on osana edistyksellisiä yhdistelmämodulaattorihoitoja. Esimerkkinä tästä on muun muassa Ivacaftorin ja Tezacaftorin yhdistelmä, jolla hoidetaan KF-potilaita, joilla on F508del-mutaatio. Lisäksi se toimii hoitona myös 26 muulle eri variantille (Joshi *et al.* 2019).

Pseudomonas aeruginosa on tyypillinen patogeeni kystistä fibroosia sairastavan henkilön hengitysteissä ja keuhkoissa. Sen on todettu olevan suoraan yhteydessä henkilön terveydentilan heikentymiseen ja ennen pitkää myös menehtymiseen. Tutkimus, joka tehtiin kystistä fibroosia sairastaville henkilöille, joilla on ainakin yksi G551D-mutatoitunut alleeli osoittaa Ivacaftor/VX-770-lääkkeen toimivan myös joitakin tyypillisiä patogeenejä vastaan. *Pseudomonas aeruginosa*- ja *Aspergillus*-patogeenejä esiintyi huomattavasti vähemmän Ivacaftor/VX-770-lääkkeen käytön jälkeen. Parhaimmat tulokset oli saatu niiltä henkilöiltä, joilla kystinen fibroosi ei vielä aiheuttanut vakavampia oireita. CFTR-modulaattoreista voi tulevaisuudessa mahdollisesti tulla vastaus myös kystisestä fibroosista aiheutuviin infektoihin. Modulaattoreiden suosiminen hoitomuotona vähentäisi myös lukuisten antibioottien käytöstä johtuvia sivuvaikutuksia (Heltshe *et al.* 2015).

CFTR-rakennetta käsittelevässä tutkimuksessa saatiin kryoelektronimikroskoopin avulla lisää tietoa CFTR-proteiinin konformaatioista ja Ivacaftorin sitoutumisesta siihen (Kuva 9). Tutkimuksessa saatiin lisää tietoa myös CFTR-proteiinin N-päästä, jossa on lassomotiivi. Lassomotiivi kiertyy TMD1:een kuuluvan TM2:n ja TM6:n, sekä TMD2:een kuuluvan TM10:n ja TM11:sta ympärille. R-domeeni sijoittuu NBD1:n ja NBD2:n väliin estäen niiden vuorovaikutuksen keskenään. TMD2:een kuuluva TM8 sijaitsee lähellä kalvon läpäiseviä osia, jotka kuuluvat CFTR-kanavan porttirakenteeseen. Kyseinen alue toimii myös modulaattorimolekyylien sitoutumiskohtana (Ivacaftor). Ivacaftor sitoutuu lähelle TM8:aa, jonka seurauksena CFTR-kanavan portin toiminta parantuu (Kleizen *et al.* 2020). Tutkimus ehdottaa, että Ivacaftor-molekyyli stabilisoisi avoimessa muodossa olevan CFTR-kanavan sitoutuessaan proteiinin rakenteeseen (Liu *et al.* 2019).



Kuva 9 CFTR-kanava avoimessa ja suljetussa konformaatiossa. A: CFTR-kanavan rakenne, jossa F508:n sijainti on osoitettu. Solukalvonläpäisevät osat (TM) on numeroitua. Kaksi N-glykaanua on solunulkoisessa silmukassa TM7:n ja TM8:n välillä. B ja C: ihmisen CFTR:n kryoelektronimikroskoopin avulla kuvatut rakenteet kahdesta suunnasta kuvattuna, vasemmalla defosforyloitumuoto, keskellä fosforyloitumuoto ja oikealla avoimen kanavan 3D-malli. D: Ivacaftor sitoutuneena CFTR-proteiiniin (Kleizen *et al.* 2020).

7.3 Muut modulaattorit

Toinen uusi modulaattori on Lumacaftor/VX-809, joka on kehitetty hoitona niille, joilla on F508del-mutaatio. Tämä lääke korjaa osittain proteiinin väärinlaskostumista. Korjatut CFTR-proteiinit välttäsivät hajotusprosessin ja pääsisivät solukalvolle. In vitro tehdyissä tutkimuksissa todettiin, että Lumacaftor palauttaa osittain CFTR-proteiinien toiminnan. Lääkkeen uskotaan toimivan siten, että se

stabiloi TMD1:n. In vitro tutkimukset osoittivat myös, että Lumacaftor yhdessä Ivacaftorin kanssa edisti kloridi-ionien kuljetusta (Fraser-Pitt & O'Neil 2015).

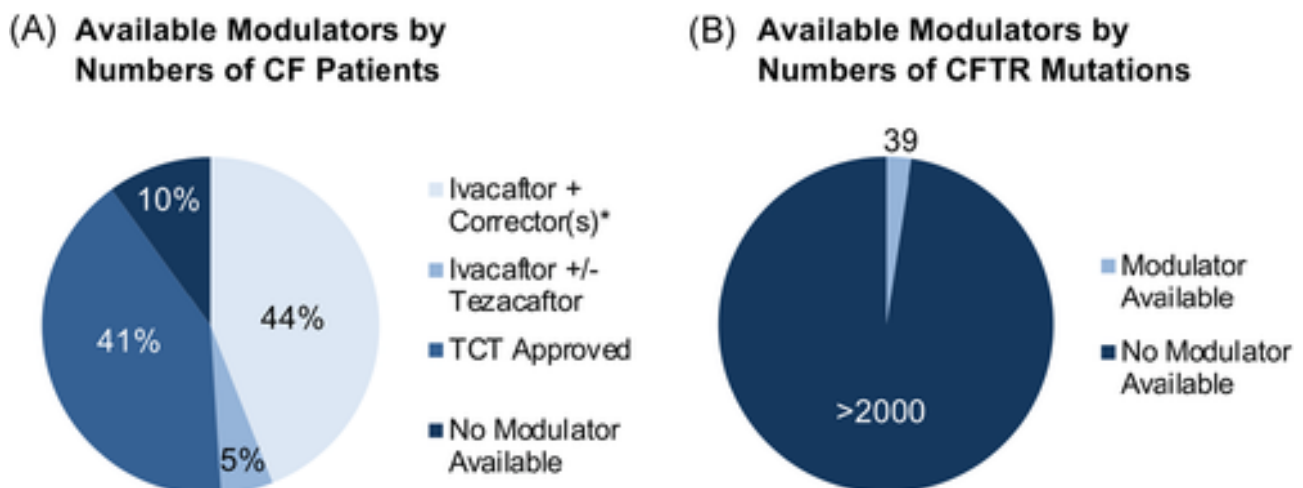
Lähivuosina saatavilla olevat hoitomuodot ovat kehittyneet erittäin paljon. Kystisen fibroosin hoito on siirtynyt vähitellen modulaattoreihin perustuvaan lääkehoitoon. Jo yksittäisillä modulaattoreilla kuten Ivacaftor/VX-770:lla on nähty olevan vaikutusta niin kokeellisella tasolla kuin myös käytännössä. Modulaattorihoidossa ongelmana on ollut pienissä määrissä tehottomuus. Ratkaisuna tähän on kehitetty ja kokeellisesti testattu erilaisia modulaattoreista koostuvia yhdistelmähoitoja. Ongelma on myös ollut se, että kystinen fibroosi voi aiheutua niin monista eri mutaatiokombinaatioista. Ratkaisuna tähän voisi olla jokaiseen kombinaatioon ja jokaiseen mutaatiotyyppiin kohdistuva modulaattorihoito. Kombinaatiot eri modulaattoreita yhdistäen kohdistuu spesifisemmin tietyn tyyppisiin mutaatioihin. Tutkimus, jossa testattiin uusia erilaisia tutkimuksen alaisuudessa olevia potentiaattoreita yhdessä Ivacaftor/VX-770:n kanssa. Sen mukaan kahden potentiaattorin yhdistäminen on tehokas hoitokeino erityisesti sellaisten mutaatioiden hoidossa, jossa CFTR-kanavan portin toiminta on heikentynyt. Tutkittu hoito toimi erityisen tehokkaasti niihin mutaatioihin, joihin yksittäisellä potentiaattorilla oli vain vähän vaikutusta (S549N, S549R, G551D, R352Q, G1244E ja S1251N) (Veit, Guido *et al.* 2019).

Tutkimus Ivacaftor/VX-770:sta ja Lumacaftor/VX-809:sta kombinaatiohoitona osoittautui tehokkaaksi henkilöille, joilla on kaksi F508del-mutaatiota. Kombinaatiohoidon on tutkittu lisäävän CFTR-proteiinin toimintaa niin paljon, että sillä olisi vaikutusta potilaiden oireiden kehittymiseen. Tästä syystä tutkimusta jatkettiin, jotta saataisiin selville sopiva ja tehokkain annostus. 24 viikkoa kestäneen tutkimuksen aikana kombinaatiohoidon aikana keuhkojen heikentyminen hidastui huomattavasti (Wainwright *et al.* 2015). Tutkimuksen mukaan kombinaatiohoito vähensi tarvetta käyttää hengitettäviä antibiootteja niillä potilailla, joilla on vakava keuhkosairaus. Lisäksi potilaiden oireet eivät pahentuneet tutkimuksen aikana ja äkillisten sairaalakäyntiä vaativien ongelmien määrä väheni hoidon aikana. Lisäksi tutkimuksesta selvisi se, että puolikas annos Ivacaftor/Lumacaftor-kombinaatioita ennen täyttä annosta vähensi tehokkaammin hengitysteiden oireita. Lisäksi hoidon keskeytyksen tarve väheni, kun käytettiin puolikasta annosta ennen kokonaiseen annokseen siirtymistä (Taylor-Cousar *et al.* 2018).

Kahdesta modulaattorista (Ivacaftor/VX-770 ja Lumacaftor/VX-809) muodostuva kombinaatiohoito on hyväksytty lääkkeenä F508del-mutaatiosta aiheutuvaan KF:ään. Tässä kombinaatiohoidossa ongelmana on sen tehottomuus joissakin solumalleissa ja ihmisille tehdyissä tutkimuksissa. Tästä syystä

kehittelään tietyille mutaatioille spesifisiä modulaattorikombinaatioita. Kahden modulaattorin kombinaatioiden lisäksi on tutkittu kahdesta korrektorista ja yhdestä potentiaattorista muodostuvaa hoitoa (Phuan *et al.* 2018). Tätä yhdistelmähoitoa kutsutaan nimellä Tricasta (triple-combination therapy, TCT). Se on kehitetty hoitomuodoksi niille, joilla on yksi F508del-mutaatio. In vitro -tutkimuksissa sen on todettu lisäävän mutatoituneen CFTR-kanavan toimintaa. Kanava on saatu toiminaan lääkeytyksen avulla jopa 85 prosenttisesti verrattuna villityyppiin. Lisäksi se on lisännyt keuhkojen toiminnan tasoa 14 % villityypin tasosta (Kleizen *et al.* 2020).

Usein tutkitut ja pitkälle kehitellyt modulaattorit ovat hyödyksi kystistä fibroosia sairastaville potilaille. Kuitenkin noin 10 % KF-potilaista ei reagoi modulaattorihoitoihin toivotulla tavalla. Ongelmallisimpia mutaatioita modulaattorihoidon kannalta ovat ennenaikaiset lopetuskodonimutaatiot ja pistemutaatiot. Näihin kuuluvat muun muassa G542X, W1282X ja N1303K mutaatiot (Phuan *et al.* 2018). Uusien modulaattorien kehittäminen kattavasti moniin eri mutaatioihin on ongelmallista, koska tiettyjä mutaatioita on erittäin vähän mukana testauksissa. Usein kehitys perustuu vain genotyyppiin, mutta ongelmana on se, että arvioiden mukaan yli 1000 eri CFTR-varianttia maailmassa edustaa vain alle viisi potilasta (Kuva 10) (Joshi *et al.* 2019).



Kuva 10 Modulaattorien käyttöä hoitona kystiseen fibroosiin kuvaava diagrammi. A: henkilöt, joilla on hyväksytty modulaattori (30 000 potilasta Yhdysvalloissa) Tähti kuvaa F508del / F508del-genotyyppiä ja merkitsee ivakaftorin hyväksymistä yhdessä joko lumacaftorin, tezakaftorin tai osana TCT:tä tezakaftorin / elexacaftorin kanssa (44 % CF-potilaista). Henkilöt, joilla on heterosygoottinen genotyyppi F508del CFTR:lle, edustavat 41 % potilaspopulaatiosta, ja heidät hyväksytään TCT:hen. Potilaita 4–5 % hyväksytään ivacaftor +/- tezacaftor -hoitoon (ei ole F508del-alleelia). Noin 10 prosentilla KF-potilaista ei tällä hetkellä ole modulaattoria käytettävissä. B: KF-varianttien alajoukko, jolla on hyväksytty modulaattori (Joshi *et al.* 2019).

8 Johtopäätökset

Tällä hetkellä suurin osa kystisen fibroosin vaikutuksista on tiedossa. Lähes kaikkien mutaatioiden genotyyppi on kyetty osittain tai kokonaan yhdistämään taudin mahdolliseen kulkuun. Edelleen on kuitenkin olemassa harvinaisempia mutaatioita ja oireita, joita ei ole pystytty yhdistämään kystiseen fibroosiin. Mutaatiot on pystytty luokittelemaan sen mukaan, mikä niiden vaikutus on CFTR-proteiiniin. Tämä on entisestään edistänyt lääkkeiden ja hoitojen kehitystä. Lääkkeillä voidaan nyt spesifemmin hoitaa eri mutaatiotyyppisiä, jolloin niiden tehokkuus on mahdollisimman hyvä. Tällä hetkellä kehitteillä olevat KF lääkkeet, joiden toiminta perustuu CFTR-proteiinin muokkaamiseen oikeanlaiseen konformaatioon ovat tulevaisuudessa lupaava hoitokeino kystiseen fibroosiin. Tärkeitä kehityksen kohteita ovat mahdollisesti myös henkilökohtaisesti suunnitellut hoidot ja yhdistelmälääkkeet, jotka perustuvat potilaan genotyyppiin ja oireisiin. Vielä jää nähtäväksi voidaanko varhaisilla toimenpiteillä kuten modulaattorihoidoilla edistää keuhkojen toimintaa ja hidastaa sairauden etenemistä pitkällä tähtäimellä, nämä hoidot kuitenkin tarjoavat toivoa myös muilla tukevilla hoidoilla. CFTR-proteiinin laskostumiseen ja toimintaan kohdistuvat hoidot voivat tulevaisuudessa pidentää KF-potilaiden elinikää ja hidastaa sairauden etenemistä (Fraser-Pitt & O'Neil 2015).

Modulaattorihoidojen lisäksi geenikorjaus CRISPR/Cas9 -menetelmällä voisi olla tulevaisuudessa ratkaisuna kystisen fibroosin parantamiseen täysin. Ehkä tulevaisuudessa olisi mahdollista parantaa kystinen fibroosi geenistä tai sen transkriptiomasta tuotteesta lähtien (Kleizen *et al.* 2020).

- Bacci G, Mengoni A, Fiscarelli E, Segata N, Taccetti G, Dolce D, Paganin P, Morelli P, Tuccio V, De Alessandri A, Lucidi V & Bevivino A (2017) A Different Microbiome Gene Repertoire in the Airways of Cystic Fibrosis Patients with Severe Lung Disease. *Int J Mol Sci pii*: E1654.
- Bonadia LC, de Lima Marson, Fernando Augusto, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF & Bertuzzo CS (2014) CFTR Genotype and Clinical Outcomes of Adult Patients Carried as Cystic Fibrosis Disease. *Gene* 540: 183-190.
- Bowen S & Hull J (2015) The Basic Science of Cystic Fibrosis. *Paediatr. Child Health* 25: 159-164.
- Burney TJ & Davies JC (2012) Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 5: 29-36.
- Cant N, Pollock N & Ford RC (2014) CFTR Structure and Cystic Fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 52: 15-25.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radjokovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J & Elborn JS (2008) Consensus on the use and Interpretation of Cystic Fibrosis Mutation Analysis in Clinical Practice. *J Cyst Fibros* 7: 179-196.
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16: 45-56.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, LeGrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ & Campbell PW (2008) Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr* 153: 4-14.
- Fraser-Pitt D & O'Neil D (2015) Cystic fibrosis - a multiorgan protein misfolding disease. *Future Sci OA* 1: FSO57.
- Heltshe SL, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Khan U, Baines A, Ramsey BW, Rowe SM & GOAL (the G551D Observation-AL) Investigators of the Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network (2015) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR treated with ivacaftor. *Clin Infect Dis* 60: 703-712.
- Joshi D, Ehrhardt A, Hong JS & Sorscher EJ (2019) Cystic fibrosis precision therapeutics: Emerging considerations. *Pediatr Pulmonol* 3: 13-17.
- Kleizen B, Hunt JF, Callebaut I, Hwang T, Sermet-Gaudelus I, Hafkemeyer S & Sheppard DN (2020) CFTR: New Insights into Structure and Function and Implications for Modulation by Small Molecules. *Journal of CF* 19: 19-24.
- Liou TG (2019) The Clinical Biology of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Protein: Its Role and Function in Extrapulmonary Disease. *Chest* 155: 605-616.

- Liu F, Zhang Z, Levit A, Levring J, Touhara KK, Shoichet BK & Chen J (2019) Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation. *Science* 364: 1184-1188.
- Liu F, Zhang Z, Csanády L, Gadsby DC & Chen J (2017) Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell* 169: 85-95.
- McKone EF, Velentgas P, Swenson AJ & Goss CH (2015) Association of Sweat Chloride Concentration at Time of Diagnosis and CFTR Genotype with Mortality and Cystic Fibrosis Phenotype. *J Cyst Fibros* 14: 580-586.
- Mitomo K, Griesenbach U, Inoue M, Somerton L, Meng C, Akiba E, Tabata T, Ueda Y, Frankel GM, Farley R, Singh C, Chan M, Munkonge F, Brum A, Xenariou S, Escudero-Garcia S, Hasegawa M & Alton EW (2010) Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Mol Ther* 18: 1173-1182.
- Patrick AE & Thomas PJ (2012) Development of CFTR Structure. *Front Pharmacol* 3: 162.
- Phuan P, Son J, Tan J, Li C, Musante I, Zlock L, Nielson DW, Finkbeiner WE, Kurth MJ, Galletta LJ, Haggie PM & Verkman AS (2018) Combination Potentiator ('co-Potentiator') Therapy for CF Caused by CFTR Mutants, Including N1303K, that are Poorly Responsive to Single Potentiators. *J Cyst Fibros* 17: 595-606.
- Pranke IM & Sermet-Gaudelus I (2014) Biosynthesis of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Int J Biochem Cell Biol* 52: 26-38.
- Schluchter MD, Konstan MW, Drumm ML, Yankaskas JR & Knowles MR (2006) Classifying severity of cystic fibrosis lung disease using longitudinal pulmonary function data. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 780-786.
- Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, Sharma N, Ramalho AS, Amaral MD, Dorfman R, Zielenski J, Masica DL, Karchin R, Millen L, Thomas PJ, Patrinos GP, Corey M, Lewis MH, Rommens JM, Castellani C, Penland CM & Cutting GR (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 45: 1160-1167.
- Taylor-Cousar JL, Jain M, Barto TL, Haddad T, Atkinson J, Tian S, Tang R, Marigowda G, Waltz D & Pilewski J (2018) Lumacaftor/Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and Advanced Lung Disease Homozygous for F508del-CFTR. *J Cyst Fibros* 17: 228-235.
- Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL & Lukacs GL (2016) From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 27: 424-433.
- Veit G, Da Fonte DF, Avramescu RG, Premchandrar A, Bagdany M, Xu H, Bensinger D, Stubba D, Schmidt B, Matouk E & Lukacs GL (2019) Mutation-Specific Dual Potentiators Maximize Rescue of CFTR Gating Mutants. *J Cyst Fibros pii*: 1569-1993.
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A,

Ratjen F, Rowe SM, Waltz D & Boyle MP (2015) Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 373: 220-231.

Wang Y, Wrennall JA, Cai Z, Li H & Sheppard DN (2014) Understanding how Cystic Fibrosis Mutations Disrupt CFTR Function: From Single Molecules to Animal Models. *Int J Biochem Cell Biol* 52: 47-57.

Zhang Z, Liu F & Chen J (2017) Conformational Changes of CFTR upon Phosphorylation and ATP Binding. *Cell* 170: 483-491.